

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Química

Tarciane da Silva Pinto

**FILMES AUTOMONTADOS BASEADOS NOS BIOPOLÍMEROS QUITOSANA E
COLÁGENO COM *CARBON QUANTUM DOTS* COM POTENCIAIS APLICAÇÕES
TECNOLÓGICAS**

**Diamantina – MG
2017**

Tarciane da Silva Pinto

**FILMES AUTOMONTADOS BASEADOS NOS BIOPOLÍMEROS QUITOSANA E
COLÁGENO COM *CARBON QUANTUM DOTS* COM POTENCIAIS APLICAÇÕES
TECNOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Mesquita

**Diamantina – MG
2017**

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

P659f Pinto, Tarciane da Silva.
2017 Filmes automontados baseados nos biopolímeros quitosana e
 colágeno com Carbon Quantum Dots com potenciais aplicações
 tecnológicas / Tarciane da Silva Pinto. – Diamantina, 2017.
 125 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Mesquita

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em
Química) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri.

1. Carbon Dots. 2. Quitosana. 3. Colágeno. 4. Layer-by-layer. I.
Mesquita, João Paulo de. II. Título.

CDD 547.8

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tarciane da Silva Pinto

FILMES AUTOMONTADOS BASEADOS NOS BIOPOLÍMEROS QUITOSANA E COLÁGENO COM *CARBON QUANTUM DOTS* COM POTENCIAIS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Mesquita

Data de aprovação 23/03/2017

Prof(a). Dr(a). Débora Vilela Franco
Instituto de Ciência e Tecnologia - UFVJM

Prof. Dr. Everton Luiz de Paula
Diretoria de Educação a Distância - UFVJM

Prof. Dr. João Paulo de Mesquita
Departamento de Química – UFVJM
Presidente

**Diamantina – MG
2017**

Aos meus pais, Tarcísio e Elvira.

Ao meu irmão Talisson.

As minhas tias Ceia e Taca.

A minha vó Rosária (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela minha saúde e por ter colocado “anjos” em minha vida para me aconselhar, acompanhar e me dar forças para continuar.

Aos meus pais, Tarcísio e Elvira, por todo amor, carinho, dedicação, confiança, proteção e apoio em todos os momentos da minha vida. Vocês são meu maior orgulho! Pai, você é meu exemplo de paciência. Mãe, você é meu exemplo de alegria. Obrigada por acreditarem que eu conseguiria chegar até aqui, mesmo quando eu pensei em desistir. Ao Talisson, o irmão perfeito! Obrigada pequeno, por todo amor, carinho, apoio e pelas noites sem dormir cuidando de mim em cada crise que tive. Obrigada pelas madrugadas de conversas e risadas assistindo vídeos, séries e ouvindo podcasts, você alegrou meus dias em Diamantina.

A minha família, em especial as minhas tias Ceia e Taca, que me deram muito amor, carinho e apoio. Ao meu primo Renato, pelas noites de Natal e dias de descontração pela internet, com muitos conselhos e desabafos, pois a química não é fácil e pesquisa leva tempo. Obrigada por dividir experiências e pela presença mesmo com a distância.

Ao meu orientador João Paulo, pela atenção, ensinamentos, disposição, dedicação e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos, Annelise, Andressa e Júnior, por todas as risadas, carinho, ajuda e apoio durante a graduação e o mestrado, vocês me ajudaram a crescer. Ao Fernando e a Mainara, amigos que o mestrado trouxe, obrigada por dividir os desesperos durante as disciplinas e me fazerem rir de dias ruins, com vocês meus dias foram mais leves e felizes. A Larissa, por me acolher quando decidi mudar de área, por me ajudar em tudo que precisei e por me fazer sorrir quando os dias no laboratório foram difíceis. A Laryssa, que mesmo ausente se faz presente em cada lembrança, sem você eu não chegaria até aqui. Ao César, pelo carinho, apoio, força e companheirismo em todos os momentos. Aos amigos que mantive e aos novos que encontrei pelo caminho, obrigada por me ajudarem nesta caminhada.

Aos técnicos e companheiros de laboratório, em especial a Priscilla, por me ajudar no desenvolvimento deste trabalho e me fazer rir durante o processo, e ao Paulo, pela confiança, carinho e por me ajudar em alguns momentos de desespero profissionais e pessoais.

Ao professor Rodrigo Verly e ao grupo de pesquisa LASEB pela colaboração.

Ao professor Fabiano Pereira, da UFMG, pela colaboração.

A todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho, *thanks!*

RESUMO

Neste trabalho, *Carbon Dots* (CDs) obtidos a partir de celulose de algodão e contendo $4,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ de grupos funcionais ácidos, dos quais 63 % exibiam pKas típicos de ácidos carboxílicos foram usados na preparação de filmes automontados com os biopolímeros quitosana (QT) e colágeno (CL) a fim de verificar a morfologia, espessura e interações moleculares entre os componentes. A quitosana usada apresentou um total de $4,2 \text{ mmol.g}^{-1}$ de grupos funcionais -NH_2 , correspondente a um grau de desacetilação de $\sim 70 \%$. Por outro lado, o colágeno hidrolisado apresentou diferentes grupos funcionais com acidez de Brønsted, típicos da presença de diferentes aminoácidos na estrutura. Todos os filmes finos foram preparados com a técnica de deposição camada por camada (do inglês: *Layer-by-layer* (LbL)) por meio de imersão do substrato nas diferentes soluções. Os materiais foram caracterizados por diferentes técnicas, incluindo Microscopia de Força Atômica, Espectroscopia na região do UV-Vis, Espectroscopia de Ressonância de Plasma de Superfície e Titulação Calorimétrica. Em todas as condições experimentais utilizadas para o crescimento dos filmes, observou-se um crescimento linear da quantidade de material depositado com o número de imersões realizadas. No entanto, diferentes condições das soluções dos biopolímeros e da suspensão de *Carbon Dots* produziram filmes com espessura e morfologia diferentes. Nos filmes de QT/CDs a quantidade de nanopartículas depositadas por bicamada, com solução de quitosana em $\text{pH} = 3,5$, $\text{pH} = 5$ e $\text{pH} = 3,5$ na presença de $0,1 \text{ mol/L}$ de NaCl, foram, respectivamente, 11 mg.m^{-2} , 16 mg.m^{-2} e 24 mg.m^{-2} sendo as espessuras dos filmes, com 20 bicamadas, correspondentes a estas quantidades foram de 60, 150 e 200 nm. Este resultado é atribuído ao aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas dos biopolímeros, as quais estão menos carregadas. Dessa forma, as cadeias podem apresentar conformações mais adequadas para recobrir eficientemente a estrutura das nanopartículas quase esféricas. Além disso, o aumento da força iônica da solução de *Carbon Dots* também contribui para o aumento de material depositado devido à formação de aglomerados sob estas condições. Nos filmes de CL/CDs, a quantidade de nanopartículas depositadas, com solução de colágeno em $\text{pH} = 3,16$, $\text{pH} = 5$ e $\text{pH} = 3,16$ na presença de $0,1 \text{ mol/L}$ de NaCl, foram $2,3 \text{ mg.m}^{-2}$, $6,46 \text{ mg.m}^{-2}$ e $6,41 \text{ mg.m}^{-2}$, respectivamente. No entanto, a energia de interação, obtida por calorimetria isotérmica, é maior em pH baixo. Em geral, a quantidade de material depositado nos filmes de colágeno é bem inferior às observadas para os filmes de QT/CDs e, conseqüentemente, filmes com espessuras entre 40 e 50 nm. Além disso, não foi observada

variação significativa entre as massas depositadas nestes filmes com o aumento do pH e força iônica. Estes resultados podem estar relacionados à menor “carga parcial positiva” sobre as cadeias da proteína em relação a quitosana, observada pelos potenciais zeta nestas condições. Por fim, os resultados aqui apresentados sugerem que as estruturas dos filmes, isto é, morfologia e espessura, podem ser facilmente controladas e reproduzidas manipulando-se as condições das soluções dos biopolímeros, além do tradicional número de imersões. Em adição, o estudo pode contribuir para o desenvolvimento de uma nova classe de dispositivos de alto desempenho, como sensores e superfícies fotoativas.

Palavras-chaves: *Carbon Dots*, quitosana, colágeno, *Layer-by-layer*.

ABSTRACT

In the present work, Carbon Dots (CDs), obtained from cotton cellulose and containing 4.5 mmol g^{-1} of acid functional groups, of which 63% exhibited typical pK_a 's compared to carboxylic acids, were used in the preparation of self-assembled films with the biopolymers Chitosan (QT) and Collagen (CL) in order to verify the morphology, thickness and molecular interactions among the components. The chitosan used in this work had a total of 4.2 mmol g^{-1} of functional groups $-\text{NH}_2$, corresponding to a deacetylation degree of $\sim 70\%$. On the other hand, the hydrolyzed collagen showed different functional groups with Brønsted acidity typical to the presence of different amino acids in the structure. All the thin films were prepared using the Layer-by-layer method (LbL) by immersing the substrate in different solutions. The materials were characterized by several techniques, such as Atomic Force Microscopy, UV-Vis Spectroscopy, Surface Plasmon Resonance and Calorimetric Titration. It was observed, in all experimental conditions for the growth of the films, a linear increase in the amount of deposited material with the number of immersions performed. However, different conditions of the biopolymer solutions produced films with different thickness and morphology. In the films QT/CDs the amount of nanoparticles deposited per bilayer, with the chitosan solution at $\text{pH} = 3.5$, $\text{pH} = 5$ and $\text{pH} = 3.5$ with the presence of 0.1 mol L^{-1} of NaCl, were, respectively, 11 mg m^{-2} , 16 mg m^{-2} and 24 mg m^{-2} with the thickness of the film, at 20 bilayers, at 60, 150 and 200 nm. This result is associated to the increase in the flexibility of the polymeric chains of the biopolymers, which are less charged. Thus, the chains can present conformations that are proper to cover more efficiently the structure of the almost spherical nanoparticles. Furthermore, the increase of the ionic strength of the Carbon Dots solution also contributes to the increase of the material deposited due to the formation of agglomerates in these conditions. In the films CL/CDs, the amount of nanoparticles deposited, with the collagen solution at $\text{pH} = 3.16$, $\text{pH} = 5$ and $\text{pH} = 3.16$ in the presence of 0.1 mol L^{-1} of NaCl, were 2.3 mg m^{-2} , 6.46 mg m^{-2} and 6.41 mg m^{-2} , respectively. However, the interaction energy, obtained by isothermal calorimetry, is higher in low pH. In general, the amount of material deposited on the collagen films is much lower than that observed for the QT/CDs films and, consequently, films thickness are 40 and 50 nm. Besides that, it was not observed any significant variation between the masses deposited in these films with the increase of the pH and the ionic strength. These results may be associated to the lower "partial positive charge" on the protein chains in relation to the chitosan, observed by the zeta potentials in these

conditions. The presented results suggest that the structures of the films, i.e. morphology and thickness, can be easily controlled and reproduced manipulating the conditions of the biopolymer solutions and the number of immersions. Additionally, the study may contribute to the development of a new class of high performance devices, such as sensors and photoactive surfaces.

Keywords: Carbon Dots, chitosan, collagen, Layer-by-layer.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CDs	<i>Carbon Dots</i>
CL	Colágeno
CL/CDs	Colágeno/ <i>Carbon Dots</i>
Eg	<i>Band-Gap</i>
GD	Grau de Desacetilação
Gly	Glicina
Hyp	Hidroxiprolina
IVTF	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MET-AR	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
MFA	Microscopia de Força Atômica
Potencial ζ	Potencial Zeta
Pro	Prolina
QT	Quitosana
QT/CDs	Quitosana/ <i>Carbon Dots</i>
RMS	Rugosidade Média
RPS	Ressonância de Plasma de Superfície
TC	Titulação Calorimétrica
TG	Análise Termogravimétrica
TG-MS	Análise Termogravimétrica acoplada ao Espectrômetro de Massa
UR	Unidades de Ressonância
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
ϵ	Absortividade molar
Λ	Comprimento de onda
Π	Orbital ligante π
π^*	Orbital antiligante π
N	Orbital não ligante

Sumário

Introdução	1
Capítulo I – Revisão Bibliográfica	3
I.1. <i>Carbon Dots (CDs)</i>	4
I.1.1. Preparação dos <i>Carbon Dots</i>	5
I.1.2. Propriedades ópticas dos <i>Carbon Dots</i>	8
I.1.3. Aplicações dos <i>Carbon Dots</i>	12
I.2. Quitosana	15
I.2.1. Aplicações do biopolímero quitosana	16
I.3. Colágeno	19
I.3.1. Aplicações do biopolímero colágeno	20
I.4. Nanocompósitos	22
I.4.1. Técnica <i>Layer-by-Layer (LbL)</i>	23
Capítulo II - Objetivos	25
II.1. Objetivo Geral	25
II.2. Objetivos Específicos	25
Capítulo III – Parte Experimental	26
III.1. Materiais e Reagentes	27
III.2. Síntese dos <i>Carbon Dots</i>	27
III.3. Preparação dos filmes automontados <i>LbL</i> por imersão	28
III.3.1 Preparação da solução de quitosana	28
III.3.2. Preparação da solução de colágeno	28
III.3.3. Preparação dos substratos utilizados na técnica de deposição camada por camada (<i>LbL</i>)	28
III.3.4. Preparação dos nanocompósitos de quitosana e <i>Carbon Dots</i>	29
III.3.5. Preparação dos nanocompósitos de colágeno e <i>Carbon Dots</i>	29
III.4. Caracterização dos materiais	30

III.4.1. Ressonância de Plasma de Superfície.....	30
III.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	32
III.4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	32
III.4.4. Titulação Potenciométrica	32
III.4.5. Potencial Zeta	33
III.4.6. Viscosidade.....	33
III.4.7. Espectroscopia Eletrônica UV-Vis.....	34
III.4.8. Microscopia de Força Atômica.....	35
III.4.9. Titulação Calorimétrica	35
Capítulo IV – Caracterização dos <i>Carbon Dots</i>, Quitosana e Colágeno.....	38
IV.1. Caracterização dos <i>Carbon Dots</i>	39
IV.2. Caracterização da quitosana	45
IV.3. Caracterização do colágeno.....	50
IV.4. Conclusões parciais	54
Capítulo V – Caracterização dos filmes QT/<i>CDs</i>	55
V.1. Adsorção das camadas e massa depositada dos filmes QT/ <i>CDs</i>	56
V.2. Morfologia e espessura dos filmes QT/ <i>CDs</i>	68
V.3. Interação entre os componentes dos filmes de QT/ <i>CDs</i>	73
V.4. Conclusões parciais	74
Capítulo VI – Caracterização dos filmes CL/<i>CDs</i>	75
VI.1. Adsorção de camadas e massa depositada dos filmes CL/ <i>CDs</i>	76
VI.2. Morfologia e espessura dos filmes CL/ <i>CDs</i>	85
VI.3. Análise termodinâmica.....	90
VI.4. Conclusões parciais	95
Capítulo VII - Conclusão	96
Referências	98
Anexo	107

Introdução

O carbono (*do latim* carbo, carvão) é um dos elementos mais abundantes no universo e está presente na maior parte das fontes de energia utilizadas pelo homem, além de ser considerado o elemento da vida. As formas mais conhecidas de materiais de carbono são as que apresentam apenas ligações entre carbonos, como no caso do diamante, do grafite, dos carbonos amorfos (carvões ativados, carbono aerogels, *carbon Black*, *etc.*), dos fulerenos e dos nanotubos. As nanoestruturas de carbono despertam grande atenção dos pesquisadores devido as suas propriedades distintas, sendo os *Carbon Dots (CDs)* objeto de estudos mais recentes.

Os *CDs* são nanomateriais de carbono com tamanho inferior a 10 nm (XU *et al.*, 2004) e desde sua descoberta diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de propor novos métodos de preparação e modificação, além de novas aplicações (LI *et al.*, 2012; BAKER *et al.*, 2010). O que faz com que estas nanopartículas sejam interessantes são suas propriedades ópticas, em adição a alta solubilidade, baixa toxicidade, fácil modificação, biocompatibilidade, boa estabilidade química e fotoquímica (WANG; HU, 2014). Por estas propriedades, as nanopartículas têm sido consideradas em diferentes aplicações, como no desenvolvimento de novos fotocatalisadores, marcadores fluorescentes para bioimagens (*in vitro* e *in vivo*), sensores, dispositivos de conversão de energia luminosa, na preparação de nanocompósitos, entre outras.

Nanocompósitos utilizando *CDs* e matrizes poliméricas são uma alternativa interessante para diferentes aplicações, pois podem apresentar vantagens como o aperfeiçoamento de dispositivos ópticos, elétricos, fotocatalíticos e mecânicos quando comparados a qualquer um dos componentes individualmente (MORAES; BOTAN; LONA, 2014; JIANG *et al.*, 2015). A automontagem de materiais tem atraído grande atenção nos campos relacionados com o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, ópticos e fotoquímicos, principalmente por suas características como facilidade, baixo custo de preparação, possibilidade de obtenção de materiais flexíveis e biocompatibilidade quando são usados materiais adequados (KATO; AOSHIMA; KIKUCHI, 2012).

A quitosana (QT) é um derivado da quitina e apresenta baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedades antibacterianas, além de comporta-se como um polieletrólito semiflexível apresentando boa capacidade para formar filmes (RINAUDO, 2006). O colágeno (CL) é uma proteína fibrosa de origem animal e além de propriedades

como baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e adsorção, pode ser preparado em diversos formatos, incluindo esponjas, géis e folhas, e pode ser utilizado com outros materiais a fim de melhorar suas propriedades (ZUBER *et al.*, 2015; LEE; SINGLA; LEE, 2001). Se por um lado, não há nenhum relato na literatura sobre nanocompósitos de CL com *CDs*, nanocompósitos de QT com *CDs* já foram relatados (SHENG, M., *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2013; KONWAR *et al.*, 2015), porém o estudo da interface entre *CDs* e estes materiais ainda não foi relatado, sendo necessárias novas pesquisas.

No entanto, além das propriedades dos dois materiais presentes nos nanocompósitos, sabe-se que a interação entre os componentes na interface é muito importante para maximizar a performance dos dispositivos preparados, propor modificações e novas aplicações. Um método interessante para a preparação de nanocompósitos é a técnica *Layer-by-Layer (LbL)*, que consiste na adsorção sequencial e alternada de monocamadas de dois componentes de forças atrativas (DECHER, 1997).

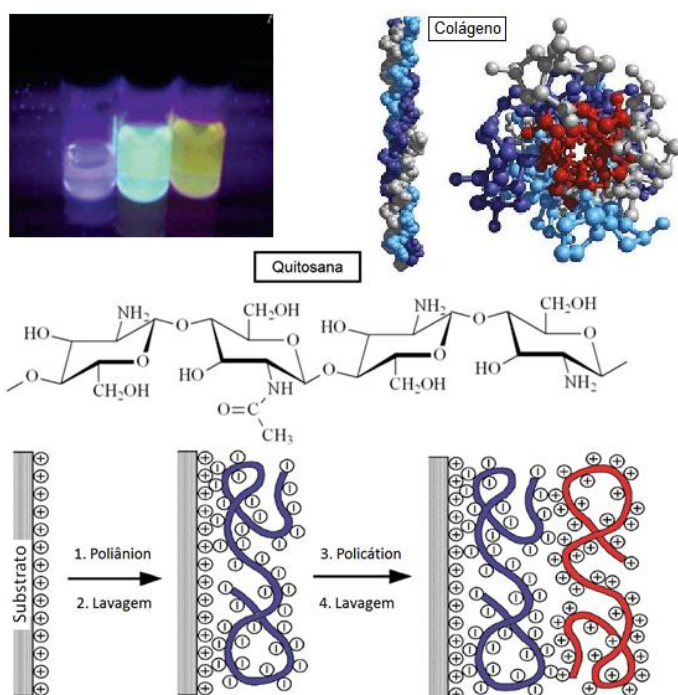
Neste trabalho filmes automontados de QT/*CDs* e CL/*CDs* foram preparados, utilizando a técnica *LbL*, e caracterizados por diferentes técnicas com o objetivo de investigar as suas propriedades e interações dos componentes nos nanocompósitos, contribuindo para o futuro desenvolvimento de novos dispositivos baseados em nanoestruturas de carbono.

No Capítulo 1 é apresentada a Revisão Bibliográfica referente ao tema, no Capítulo 2 são apresentados os Objetivos deste trabalho, no Capítulo 3 tem-se a Parte Experimental com os materiais, métodos e equipamentos utilizados, no Capítulo 4 apresenta-se a Caracterização dos *Carbon Dots*, Quitosana e Colágeno, no Capítulo 5 é apresentada a Caracterização dos filmes de QT/*CDs*, no Capítulo 6 é apresentada a Caracterização dos filmes CL/*CDs* e por fim, no Capítulo 7 é apresentada a Conclusão.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica relacionada ao tema da dissertação. Primeiramente os *Carbon Dots*, nanoestruturas de carbono descobertas em 2004, serão introduzidos apresentando-se suas propriedades, em especial suas propriedades ópticas,



métodos de preparação e algumas aplicações, incluindo a preparação de nanocompósitos. A seguir, serão discutidas as principais propriedades e aplicações de dois biopolímeros, a quitosana e o colágeno, materiais utilizados neste trabalho para a preparação de filmes automontados. Por fim, será discutido o que são nanocompósitos, suas vantagens e a importância da utilização de uma técnica adequada de preparação. Então, será apresentada a técnica de deposição

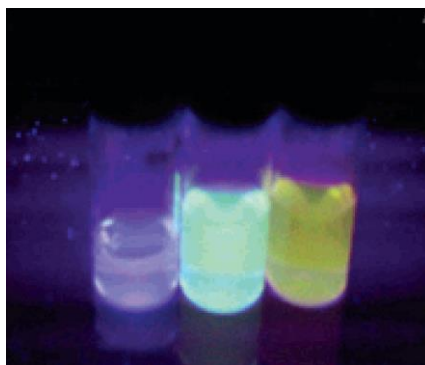
camada por camada (do inglês *Layer-by-Layer*), utilizada para a preparação de filmes automontados, indicando suas principais vantagens e algumas de suas aplicações.

Desde a sua descoberta em 2004, os *Carbon Dots (CDs)* têm sido aplicados no desenvolvimento de diferentes dispositivos eletrônicos e ópticos, muito dos quais baseados na preparação de filmes finos. Por outro lado, poucos trabalhos na literatura têm investigado com detalhes a formação dos filmes e a interação existente entre estas nanopartículas e os outros componentes estruturais, geralmente partículas metálicas e polímeros.

I.1. *Carbon Dots (CDs)*

Carbon Quantum Dots (CQDs), ou simplesmente *Carbon Dots (CDs)*, são a mais nova classe de materiais de carbono, com tamanho inferior a 10 nm, que foram descobertos em 2004 durante a purificação eletroforética de nanotubos de carbono de paredes simples (XU *et al.*, 2004). A partir do material de carbono bruto, obtido após a purificação, estes pesquisadores observaram nanotubos de carbono de paredes simples e um outro grupo de nanopartículas de carbono com características fluorescentes, que os mesmos julgaram ser impurezas obtidas no processo. Estas nanopartículas fluorescentes, conhecidas hoje como *Carbon Dots*, foram isoladas em três frações de tamanhos diferentes e expostas à luz UV de 365 nm, apresentando fluorescência de cores distintas (Figura I.1) (XU *et al.*, 2004).

Figura I.1 – Frações fluorescentes obtidas através da purificação de nanotubos de carbono.



Fonte: XU *et al.*, 2004. Adaptado.

Desde a sua descoberta, diversos grupos de pesquisa têm preparado e estudado os *CDs* fazendo com que nos últimos anos muitos progressos fossem alcançados com relação aos métodos de síntese, propriedades, modificações e aplicações (LI *et al.*, 2012; BAKER *et al.*, 2010).

Tipicamente, os *CDs* apresentam dimensões inferiores a 10 nm, morfologia quase esférica e uma estrutura essencialmente constituída de carbonos sp^2 e sp^3 (LIM; SHEN; GAO, 2015). Em adição, apresentam propriedades físico-químicas, eletrônicas e ópticas distintas.

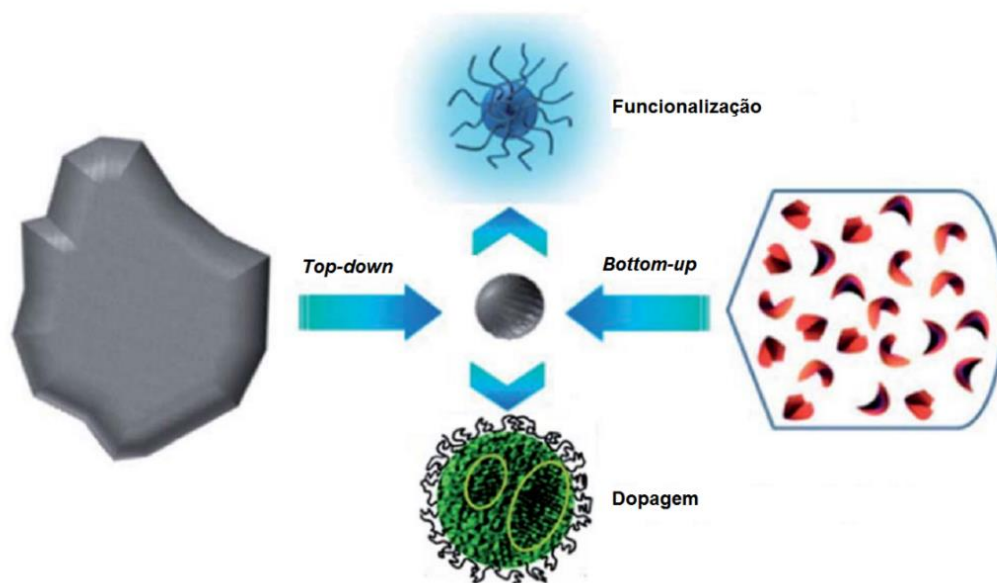
A grande atenção devotada atualmente ao estudo e aplicações destas nanopartículas são suas propriedades fotoluminescentes. Entretanto, o mecanismo para a transferência de elétrons e as propriedades ópticas dos *CDs* é incerta, mas uma clara dependência do tamanho (LI *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2015) e das propriedades de superfície das nanopartículas (TIAN *et al.*, 2014; XU, *et al.*, 2013) têm sido observadas.

Em adição a suas propriedades ópticas, como a fotoluminescência, os *CDs* apresentam alta solubilidade, baixa toxicidade, fácil modificação, biocompatibilidade e boa estabilidade química e fotoquímica, além de sua síntese ter um baixo custo (WANG; HU, 2014; NAMDARI; NEGAHDARI; EATEMADI, 2017). Assim, potenciais aplicações destas nanoestruturas, no desenvolvimento de novos fotocatalisadores, marcadores fluorescentes (*in vitro* e *in vivo*), sensores, dispositivos de conversão de energia luminosa e áreas afins, têm sido considerada.

I.1.1. Preparação dos *Carbon Dots*

Muitos métodos para a preparação dos *CDs* têm sido propostos nos últimos anos, estes métodos podem ser classificados em duas abordagens, *Top-down* e *Bottom-up*, em que as nanopartículas podem ser modificadas durante ou após a preparação (Figura I.2) (WANG; HU, 2014; SILVA; GONÇALVES, 2011). Nos métodos *Top-down*, os *CDs* são preparados a partir de precursores de carbono maiores, como grafite, nanotubos de carbono e óxido de grafite. Nos métodos *Bottom-up*, os *CDs* são preparados a partir de precursores moleculares, como ácido cítrico e glicose. Geralmente, a superfície dos *CDs* são oxidadas utilizando-se ácido nítrico (HNO_3), seguido de purificação utilizando-se centrifugação, diálise, eletroforese ou outra técnica de separação (SILVA; GONÇALVES, 2011; BAKER; BAKER, 2010).

Figura I.2 – Esquema da preparação dos CDs através das abordagens *Top-down* e *Bottom-up*, e modificações.

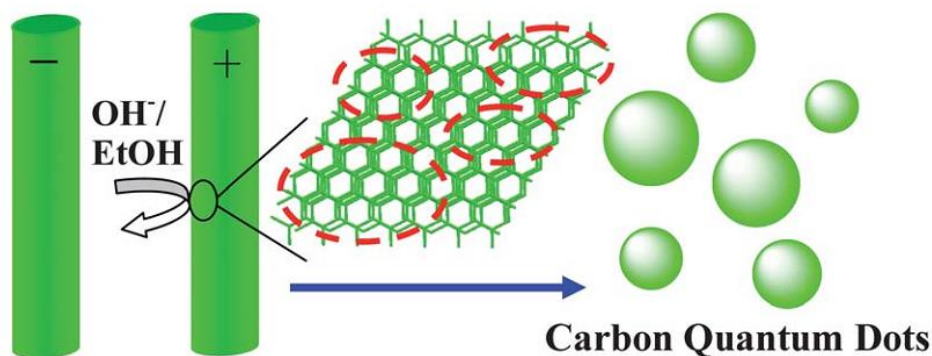


Fonte: WANG; HU, 2014. Adaptado.

Alguns métodos para a preparação de CDs descritos na literatura incluem o método eletroquímico (LI *et al.*, 2010), ablação a laser (HU *et al.*, 2009), carbonização térmica (BOURLINOS *et al.*, 2008), desidratação ácida de carboidratos (PENG; TRAVASSEJDIC, 2009), descarga de arco voltaico, pirólise, ultrassom, entre outros (SILVA; GONÇALVES, 2011).

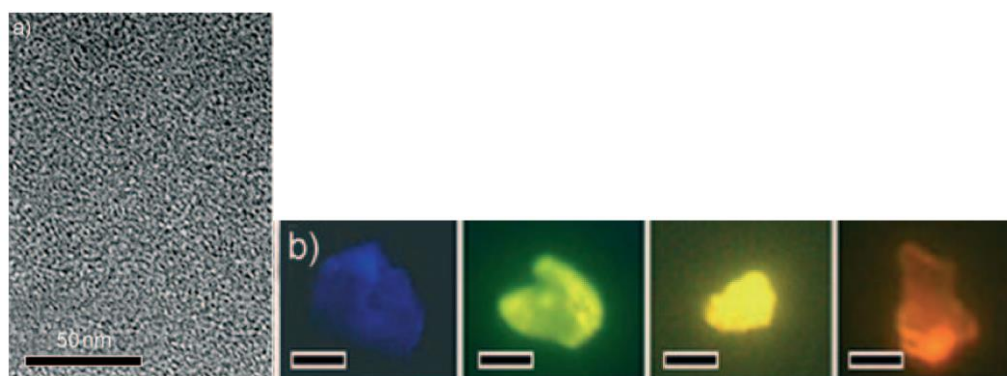
Kang e colaboradores prepararam CDs com tamanhos de 1-4 nm utilizando o método eletroquímico. Usando barras de grafite como ânodo e cátodo e NaOH/EtOH como eletrólito, prepararam as nanopartículas com uma intensidade de corrente de 10-200 mA/cm² (Figura I.3; Figura I.4). Uma série de experimentos de controle foram realizados utilizando ácidos como eletrólito, por exemplo H₂SO₄/EtOH, e estes não levaram à formação de CDs. Este resultado indica que um ambiente alcalino é um fator importante para a preparação das nanopartículas pelo método eletroquímico. (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012).

Figura I.3 – Representação da preparação dos CDs utilizando o método eletroquímico.



Fonte: LI *et al.*, 2012. Adaptado.

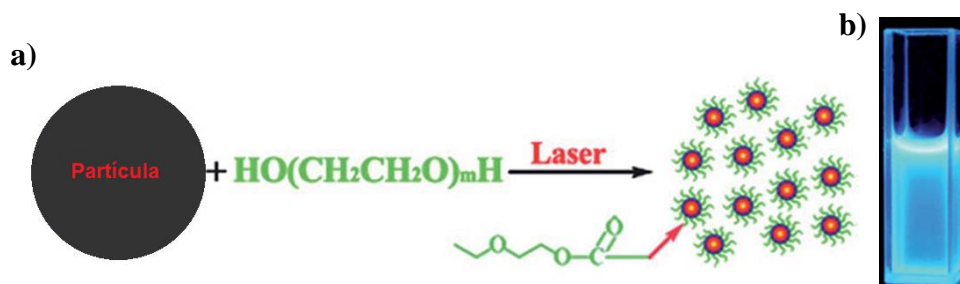
Figura I.4 – (a) Imagem de MET dos CDs com diâmetros inferiores a 4 nm; (b) Imagens de microscopia de fluorescência dos CDs em um comprimento de onda de excitação de 360 nm.



Fonte: LI *et al.*, 2010. Adaptado.

Hu e colaboradores prepararam CDs por ablação a laser usando uma suspensão de materiais de carbono em um solvente orgânico (Figura I.5). A escolha dos solventes orgânicos é importante para os estados de superfície dos CDs, pois podem ser modificados a fim de ajustar a emissão de luminescência (HU *et al.*, 2009).

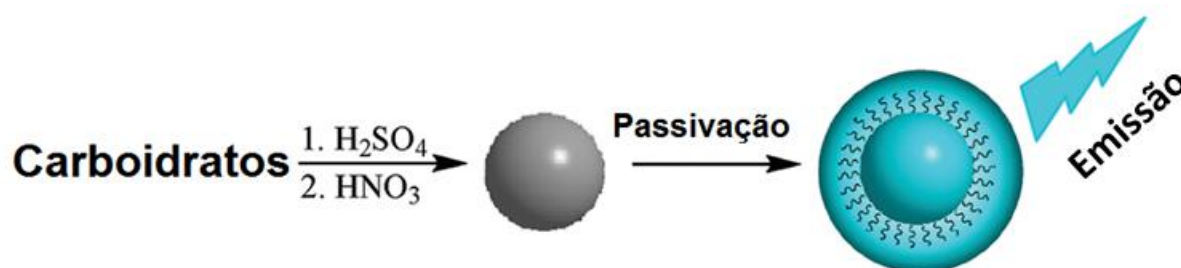
Figura I.5 – (a) Representação da preparação dos CDs em solvente $\text{PEG}_{200\text{N}}$ por irradiação a laser; (b) CDs sob luz UV em 365 nm.



Fonte: HU *et al.*, 2009. Adaptado.

Peng e colaboradores prepararam *CDs* luminescentes através de um método simples e barato, conhecido como desidratação ácida. Resumidamente, os carboidratos foram desidratados usando-se ácido sulfúrico concentrado, produzindo materiais carbonosos. Os materiais carbonosos obtidos foram então decompostos em nanopartículas de carbono por tratamento com ácido nítrico. Por fim, as nanopartículas foram passivadas utilizando-se compostos terminados em amina, produzindo *CDs* luminescentes (Figura I.6). Com a utilização desta técnica, as propriedades ópticas dos nanomateriais obtidos podem ser ajustadas utilizando-se diferentes materiais de partida e alterando-se o tempo de tratamento com ácido nítrico (PENG; TRAVAS-SEJDIC, 2009).

Figura I.6 – Esquema da preparação dos *CDs* através do Método de Desidratação Ácida.



Fonte: PENG; TRAVAS-SEJDIC, 2009. Adaptado.

Os *CDs* são facilmente preparados utilizando-se metodologias comuns e simples, porém existem alguns problemas que precisam ser observados: (i) agregação das nanopartículas de carbono durante o processo de carbonização, (ii) controle e uniformidade de tamanho, que é importante para o estudo dos mecanismos, e (iii) propriedades de superfície, que podem dificultar em algumas aplicações. Embora diversos métodos tenham sido propostos para a síntese dos *CDs*, são necessários novos estudos para melhorar e desenvolver novas metodologias. (WANG; HU, 2014).

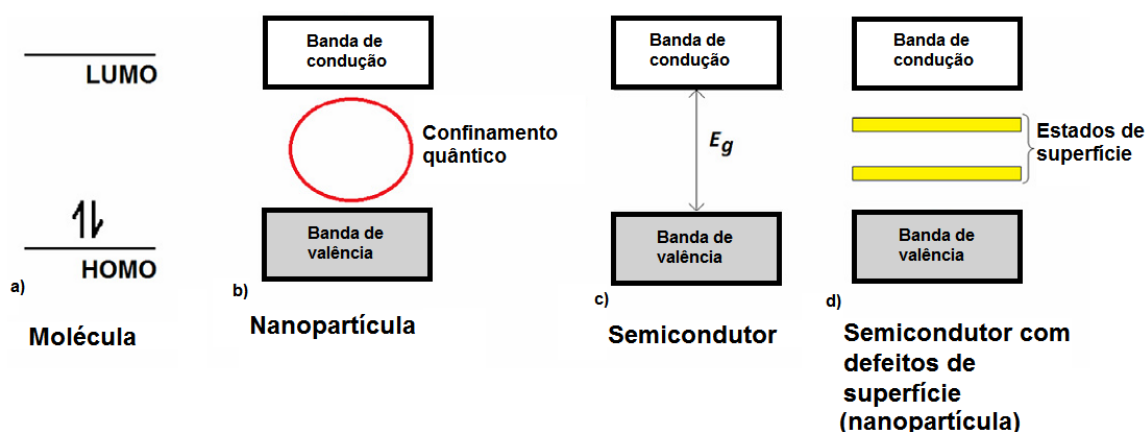
I.1.2. Propriedades ópticas dos *Carbon Dots*

Os pontos quânticos são, geralmente, semicondutores cristalinos que apresentam o efeito de confinamento quântico. Este efeito está relacionado com o confinamento, nas três dimensões do espaço, dos portadores de carga (par elétron/buraco). Devido ao efeito de confinamento quântico, as propriedades eletrônicas e ópticas dos pontos quânticos dependem do tamanho e da composição destas nanopartículas (VALE *et al.*, 2015; DABBOUSI *et al.*, 1997).

Os pontos quânticos apresentam estados de energia eletrônica que estão entre uma molécula e um semiconductor (Figura I.7). Os semicondutores são caracterizados por uma energia de *Band-Gap* (E_g) que depende da composição e corresponde à energia mínima necessária para excitar um elétron da banda de valência para a banda de condução. Quando um elétron da banda de valência, no estado fundamental, absorve uma energia igual, ou maior, que a E_g , ele é excitado e vai para a banda de condução, originando um éxciton (par elétron/buraco). O éxciton tem um tamanho finito que é definido pelo raio de Bohr. Se o tamanho da estrutura é menor que o tamanho do éxciton tem-se um aumento da energia. Sob esta condição, conhecida como confinamento quântico, as propriedades ópticas e eletrônicas dependem do tamanho da nanopartícula. (VALE *et al.*, 2015; SILVA; GONÇALVES, 2011).

O mecanismo para a transferência de elétrons e as propriedades ópticas dos *CDs* ainda é incerta, porém sabe-se que estas propriedades podem ter origem em defeitos estruturais. Em quase todos os *CDs* que emitem luminescência pode ser observada a presença de defeitos superficiais que podem alterar o mecanismo de luminescência (Figura I.7) (SILVA; GONÇALVES, 2011; TIAN *et al.*, 2014).

Figura I.7 – Estados de energia eletrônica (a) molécula; (b) nanopartícula de um semiconductor; (c) semiconductor; (d) presença de defeitos superficiais em uma nanopartícula de um semiconductor.



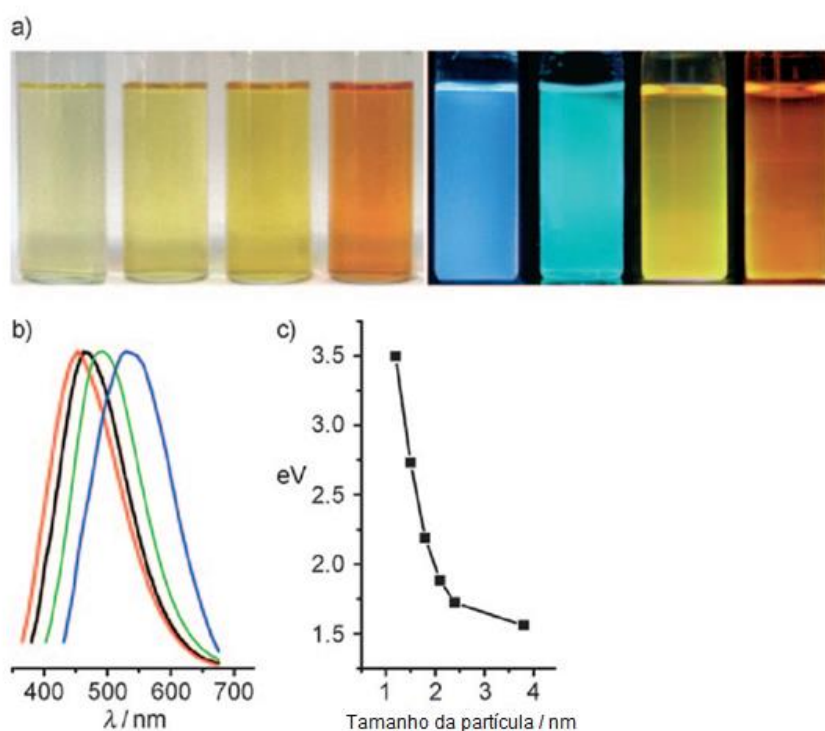
Fonte: SILVA; GONÇALVES, 2011. Adaptado.

Uma das características que fazem com que os *CDs* sejam fascinantes são suas propriedades fotoluminescentes. Na literatura, estas propriedades tem sido atribuídas a diversos motivos, como seleção óptica de nanopartículas de tamanhos diferentes, defeitos e estados de superfície, grupos funcionais, passivação da superfície, entre outros (WANG; HU, 2014; WANG *et al.*, 2013). Na maioria dos casos estudados inicialmente, uma característica

observada foi a dependência do tamanho e do comprimento de onda de excitação (LI *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013), que ocorre devido a seleção óptica das nanopartículas de tamanhos diferentes (efeito quântico), diferentes mecanismos emissivos na superfície, e/ou outros mecanismos ainda não conhecidos (LI *et al.*, 2010).

Li e colaboradores prepararam *CDs* utilizando o método eletroquímico seguido de uma separação utilizando cromatografia em coluna, e após a caracterização concluíram que as nanopartículas produzem diferentes cores de emissão que variam com o tamanho, onde o aumento do tamanho leva a emissões deslocadas ao vermelho (Figura I.8) (LI *et al.*, 2010).

Figura I.8 – (a) Imagens ópticas de quatro tamanhos de *CDs* iluminadas sob luz ambiente (esquerda, luz do dia) e luz UV (direita, 365 nm); (b) espectros de fotoluminescência dos *CDs* de diferentes tamanhos: as linhas vermelha, preta, verde e azul são os espectros de fotoluminescência para os *CDs* de emissão de azul, verde, amarelo e vermelho, respectivamente; (c) relação entre o tamanho dos *CDs* e as propriedades de fotoluminescência.

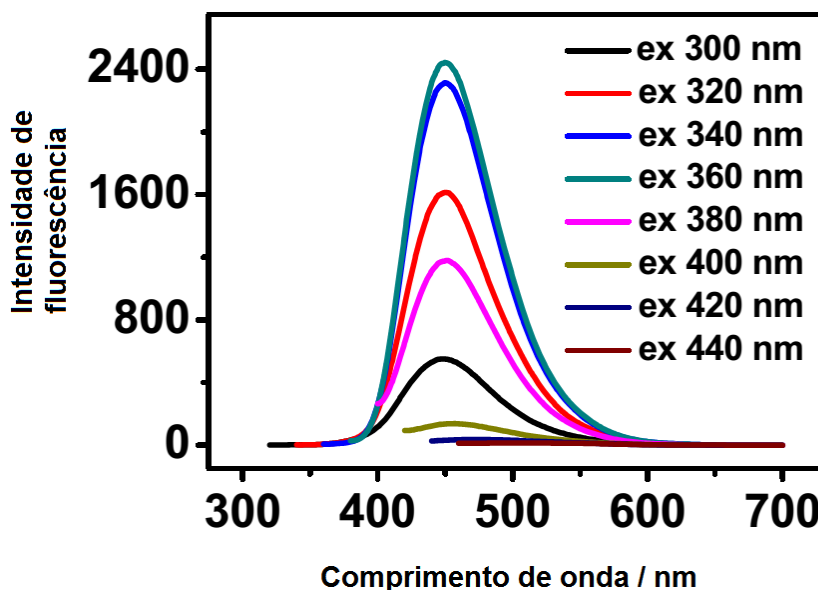


Fonte: LI *et al.*, 2010. Adaptado.

Apesar de estudos iniciais mostrarem que, além do tamanho, as propriedades fotoluminescentes dos *CDs* dependiam do comprimento de onda de excitação, novos estudos mostram que o comprimento de onda de emissão independe do mesmo (WANG *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2014).

Wang e colaboradores prepararam *CDs* dopados com nitrogênio e enxofre preparados pelo método hidrotérmico para serem utilizados na detecção de ácido úrico. Os *CDs* apresentaram comprimentos de onda de emissão independente do comprimento de onda de excitação (Figura I.9) (WANG *et al.*, 2016).

Figura I.9 – Fluorescência de *CDs* dopados com N e S em diferentes comprimentos de onda de excitação.

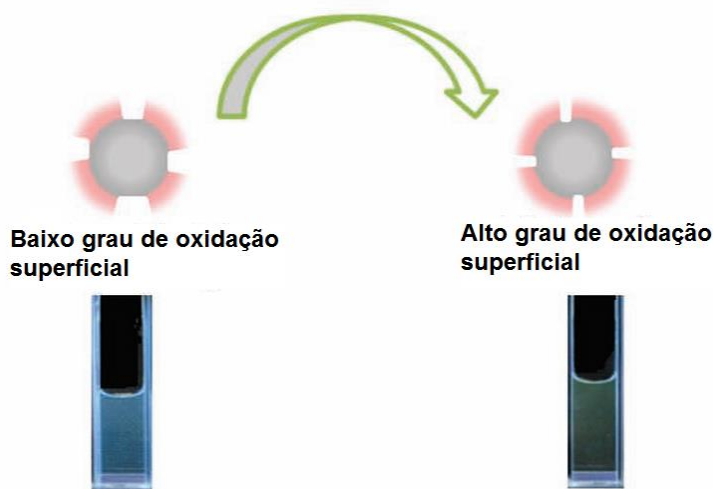


Fonte: WANG *et al.*, 2016. Adaptado.

Embora os mecanismos luminescentes dos *CDs* não sejam totalmente compreendidos, geralmente atribuem-se estes mecanismos ao efeito quântico, aos estados de superfície e a recombinação do par elétron-buraco (TUERHONG; XU; YIN, 2017).

Bao e colaboradores prepararam *CDs* através do método eletroquímico e descobriram que os mesmos tinham diferentes graus de oxidação. Os *CDs* com baixo grau de oxidação exibiram uma emissão de fluorescência na cor azul, enquanto os *CDs* com alto grau de oxidação emitiram uma fluorescência na cor verde (Figura I.10), logo, foi possível observar que os estados de superfície influenciam em suas propriedades luminescentes (BAO *et al.*, 2011).

Figura I.10 – Representação da emissão dos CDs com a variação do grau de oxidação superficial.



Fonte: BAO, *et al.*, 2011. Adaptado.

Tipicamente, os *CDs* têm uma grande quantidade de grupos de ácidos carboxílicos em sua superfície, logo, tem uma excelente solubilidade em água (BAKER; BAKER, 2010), são apropriados para a passivação superficial e para a modificação química com vários materiais poliméricos, inorgânicos, orgânicos ou biológicos. Em adição, sabe-se que as características físicas e de fluorescência são melhoradas utilizando-se a passivação superficial (NAMDARI; NEGAHDARI; EATEMADI, 2017).

I.1.3. Aplicações dos *Carbon Dots*

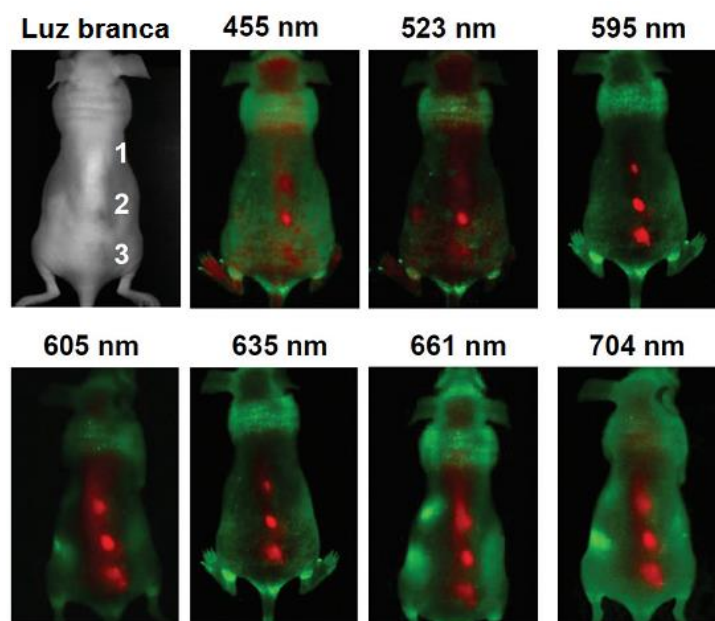
Diferentemente dos pontos quânticos tradicionais, que contêm metais pesados e são tóxicos, os *CDs* têm boas propriedades biológicas, como a baixa toxicidade e biocompatibilidade, além disso, têm excelentes propriedades eletrônicas, como bons doadores e aceptores de elétrons. Por este motivo, têm sido utilizados em diversas aplicações, como em bioimagem, sensores e biossensores, dispositivos eletrônicos, catálise, entre outras. (WANG; HU, 2014; BAKER; BAKER, 2010).

Os materiais utilizados em bioimagem, para diagnóstico bioanalítico *in vivo*, não devem ser tóxicos e devem ser biocompatíveis. Em contraste com os pontos quânticos tradicionais, que geralmente contêm cádmio, os *CDs* são nanopartículas com baixa toxicidade que, levando em consideração suas as propriedades luminescentes, são uma ferramenta bioanalítica útil e promissora (SILVA; GONÇALVES, 2011).

Tao e colaboradores realizaram estudos de fluorescência *in vivo* utilizando *CDs*. Neste estudo, os *CDs* preparados a partir de nanotubos de carbono foram inseridos em um

rato subcutaneamente em três locais diferentes. Em seguida, foram aplicados vários comprimentos de onda de excitação durante a formação da imagem *in vivo*. Como resultado, foram observadas imagens de fluorescência onde os *CDs* haviam sido injetados (em vermelho) em todos os diferentes comprimentos de onda de excitação (Figura I.11) (TAO *et al.*, 2012).

Figura I.11 – Representação da emissão dos *CDs* com a variação do grau de oxidação superficial.



Fonte: TAO *et al.*, 2012. Adaptado.

A fluorescência dos *CDs* é sensível a vários parâmetros químicos experimentais que, se controláveis, transformam *CDs* em nanosensores com grande potencial analítico (SILVA; GONÇALVES, 2011). Uma aplicação interessante dos *CDs* é no campo da detecção, onde se desenvolveu uma grande variedade de sensores biológicos/químicos com base em suas propriedades ópticas e em seus grupos funcionais de superfície (TUERHONG; XU; YIN, 2017).

Pang e colaboradores desenvolveram um sensor fluorescente utilizando *CDs* para a detecção e medição da concentração de guanina em amostras de urina e DNA. Como resultado obtiveram um excelente desempenho analítico, como alta seletividade e sensibilidade, baixo limite de detecção, ampla faixa de resposta linear, além de ter um baixo custo. (PANG *et al.*, 2016).

A eletroquimioluminescência é um meio para converter energia elétrica em energia radiativa, em que espécies geradas na superfície de um eletrodo, através de um

potencial aplicado, sofrem reações de transferência de elétrons de alta energia para produzir estados excitados que emitem sinais luminescentes que podem ser medidos (XU *et al.* 2014). Levando em consideração a eletroquimioluminescência dos *CDs*, Yang e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquimioluminescente baseado em *CDs* imobilizados em grafeno para a determinação de fenóis clorados em água, sendo o pentaclorofenol frequentemente monitorado como importante indicador em amostras ambientais reais. A detecção foi baseada nos sinais de eletroquimioluminescência a partir da interação entre os analitos e os *CDs* excitados (C^{*+}) utilizando $S_2O_8^{2-}$. O grafeno facilita a produção de $C^{\bullet-}$ e $SO_4^{\bullet-}$, resultando em uma alta quantidade de C^{*+} , levando a um efeito de amplificação eletroquimioluminescente quase 48 vezes maior. Como resultado obtiveram um sensor eletroquimioluminescente que permitiu a detecção em tempo real de pentaclorofenol com uma boa sensibilidade, que atinge uma concentração de $1,0 \times 10^{-12}$ mol/L, em uma ampla faixa linear, $1,0 \times 10^{-12}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol/L. (YANG *et al.*, 2013).

A preparação/modificação de materiais de carbono com componentes inorgânicos representa uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novas funcionalidades e para melhorar suas propriedades. Portanto, as metodologias para a construção de materiais híbridos inorgânicos com materiais orgânicos integrados em arquiteturas bem definidas são de importância significativa e podem ajudar no desenvolvimento de novos fotocatalisadores eficientes (BOZETINE *et al.*, 2016). A preparação de nanocompósitos de *CDs* com diferentes materiais como TiO_2 (LI *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2014), SiO_2 (LI *et al.*, 2010), Fe_2O_3 (ZHANG *et al.*, 2011), CdS (LIU; YU; ZHANG, 2013), entre outros, são descritos na literatura.

Bozetine e colaboradores desenvolveram uma rota simples para a preparação de nanocompósitos de ZnO/CDs . O método envolve a formação de *CDs* pela reação química de D-frutose e NaOH, seguido pela adição de sal de zinco em pH 10. A atividade fotocatalítica do nanocompósito obtido foi avaliada pela degradação do poluente orgânico Rodamina B sob irradiação de luz visível e a capacidade de fotodegradação do nanocompósito ZnO/CDs foi demonstrada a partir da comparação com as partículas de ZnO preparadas usando as mesmas condições experimentais. Os resultados mostraram que o nanocompósito era ativo sob irradiação de luz visível e sua eficiência era muito maior do que das partículas de ZnO (BOZETINE *et al.*, 2016).

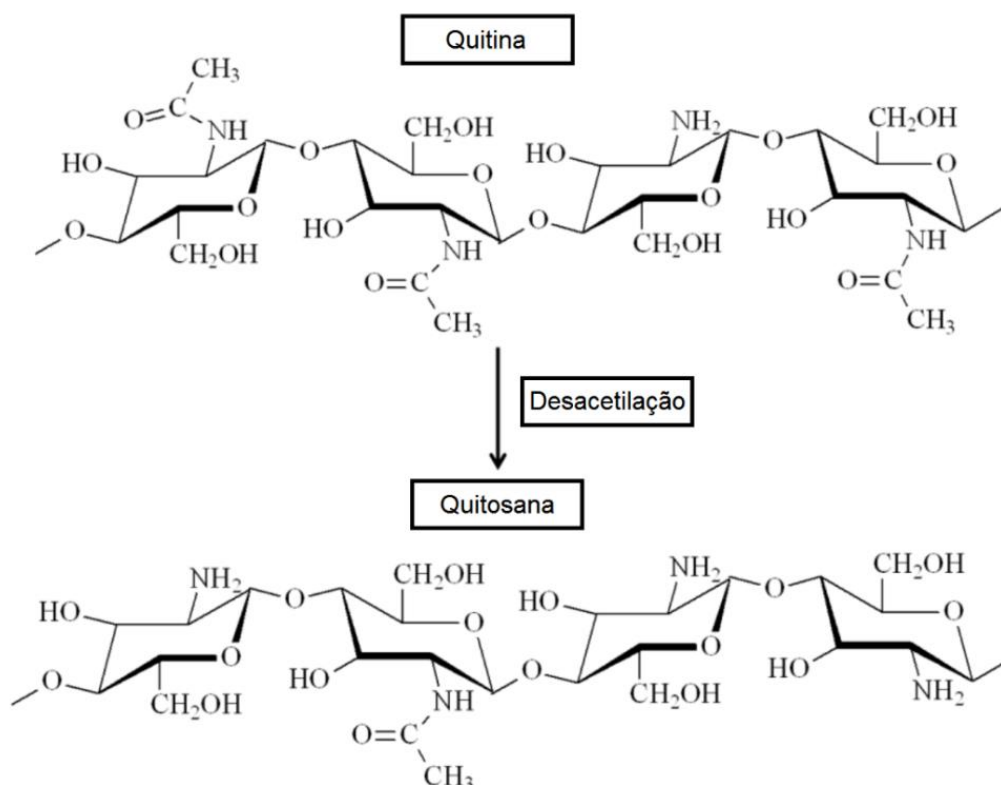
Levando em consideração as propriedades dos *CDs*, espera-se o crescimento do número de pesquisas a fim de compreender e ajustar suas propriedades para o uso em novas aplicações.

I.2. Quitosana

A quitina é um polímero natural e a segunda substância orgânica mais abundante na Terra, podendo ser extraída de plantas, invertebrados marinhos, insetos, paredes celulares de alguns fungos e microorganismos. (LUNDIN *et al.*, 2011; KASAAI, 2009). Possui uma estrutura semicristalina, que faz ligações de hidrogênio, resultando em um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, por este motivo sua utilização é limitada (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

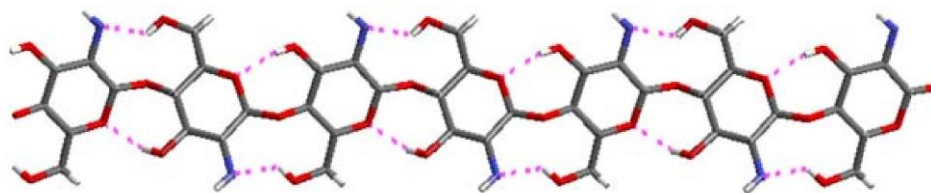
O principal derivado da quitina é a quitosana (QT), polissacarídeo catiônico fraco obtido a partir da desacetilação parcial da quitina no estado sólido sob condições alcalinas, NaOH concentrado (RINAUDO, 2006). Ambos os biopolímeros possuem unidades monoméricas β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose e se diferem quanto à proporção dessas unidades e à solubilidade (Figura I.12) (LUNDIN *et al.*, 2011; CAMPANA; SIGNINI, 2001). Quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50 %, dependendo da origem do biopolímero, torna-se solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos, devido a protonação dos grupos amino, e então passa a ser chamada de QT (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; RINAUDO, 2006).

Figura I.12 – Estruturas moleculares dos biopolímeros quitina e QT.



A solubilidade é um parâmetro difícil de se controlar, pois está relacionada ao grau de acetilação, concentração iônica, pH, natureza do ácido utilizado para a protonação, distribuição dos grupos acetila ao longo da cadeia e das condições de preparação do biopolímero. Também é importante considerar as ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia envolvendo os grupos hidroxila (Figura I.13) (RINAUDO, 2006; KASAAI, 2009).

Figura I.13 – Modelo molecular de uma cadeia de QT com duas ligações de hidrogênio: (1) entre OH(3) e O(5), e (2) entre OH(6) e N.



Fonte: RINAUDO, 2006. Adaptado.

Devido a presença dos grupos amino, a QT é um polissacárido interessante pois pode ser adequadamente modificada para se obter propriedades desejadas em determinados tipos de aplicações. (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

I.2.1. Aplicações do biopolímero quitosana

Existe, até os dias atuais, um grande interesse pela utilização de biopolímeros em diferentes áreas relacionadas a vida e a QT é um dos promissores candidatos que recebem uma atenção especial devido à abundância e às suas propriedades, como baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades que respondem às variações de pH e propriedades antimicrobianas, além de suas propriedades físicas e químicas que fazem com que possa ser utilizada na preparação de géis, filmes, fibras, esponjas, entre outros. (KONG *et al.*, 2010; DABÓCZI *et al.* 2016; RINAUDO, 2006). Em adição a estas propriedades, a QT comporta-se como um polieletrólito semiflexível e apresenta uma boa capacidade de formar filmes. Por estas características, pode ser aplicada em diversas áreas. (RINAUDO, 2006). A Tabela I.1 apresenta, resumidamente, algumas das principais aplicações da QT.

Tabela I.1 – Principais aplicações para quitosana.

Área	Aplicações
Biomédicas	Suturas cirúrgicas Medicamentos de liberação controlada Material encapsulante
Agricultura	Mecanismo defensivo em plantas Estimulação do crescimento das plantas Revestimento de sementes Liberação de fertilizantes e nutrientes no solo
Tratamento de água e resíduos	Floculante para clarificar água Remoção de íons metálicos Reduzir odores
Alimentos e bebidas	Vincular lipídios (reduzir o colesterol) Conservante Espessante e estabilizador para molhos Revestimento antibacteriano
Cosméticos e produtos de higiene pessoal	Manter a umidade da pele Tratar acne Melhorar a flexibilidade do cabelo Cuidados bucais

Fonte: RINAUDO, 2006; KASAAI, 2009. Adaptado.

Juntamente com as boas propriedades para a formação de filmes, a QT apresenta propriedades antimicrobianas contra diversas bactérias, leveduras e fungos (FRIEDMAN; JUNEJA, 2010). Por esta razão, existe um grande interesse em utilizar este biopolímero na indústria alimentícia como, por exemplo, em materiais para embalagens, para oferecer proteção contra contaminação e deterioração microbiana, podendo ser usado como material de revestimento ou como membranas semipermeáveis a gases (VAN DEN BROEK *et al.*, 2015). Além da indústria alimentícia, a QT tem sido aplicada em diversas áreas biomédicas como, por exemplo, sistemas de liberação de fármacos (KUMAR *et al.*, 2004).

Sabe-se que a camada de biopolímero, em ambiente aquoso, tem um papel decisivo nos processos de liberação de fármacos, então, Dabóczi e colaboradores propuseram

um modelo para libertação controlada de fármaco utilizando QT e sílica. O modelo consiste em um sistema de sílica mesoporosa inorgânica, para acumular e armazenar o fármaco, que é coberta por um revestimento fino de QT para controlar a liberação. Como resultado, obtiveram um efeito de retardamento significativo da liberação, levando a acreditar que o biopolímero tem grande potencial para ser utilizado como uma camada de barreira com permeabilidade controlada para atingir um tempo de liberação prolongado em sistemas de liberação de fármacos (DABÓCZI *et al.*, 2016).

Tipicamente, os polissacarídeos são conhecidos como materiais funcionais e biocompatíveis com grande capacidade de reticulação com nano e microestruturas (GAO *et al.*, 2012). A QT, polímero à base de polissacarídeo natural, é conhecido por ter um alto potencial de adsorção de corantes, íons metálicos, proteínas, entre outros (CHIOU; HO; LI, 2004), além de ter um baixo custo. Atualmente, a preparação de nanocompósitos para melhorar as propriedades mecânicas e químicas dos filmes de QT tem sido o foco de diversos grupos de pesquisa (CHIOU; HO; LI, 2004).

Rahimi e colaboradores investigaram a remoção de chumbo, Pb(II), em soluções aquosas utilizando nanocompósitos de goethita/QT. As nanopartículas de goethita foram sintetizadas e aplicadas como o agente de reforço para melhorar as propriedades de adsorção do filme de QT. O resultado do estudo de adsorção mostrou que a captação de Pb(II) foi reforçada pelo filme de QT utilizando as nanopartículas de goethita (RAHIMI *et al.*, 2015).

Nanocompósitos de QT/CDs são particularmente interessantes, principalmente porque são materiais que possuem baixa toxicidade e apresentam biocompatibilidade. Logo, na literatura recente, alguns nanocompósitos de QT/CDs têm sido relatados.

Konwar e colaboradores investigaram as propriedades termomecânicas, ópticas e hidrofílicas do nanocompósito QT/CDs e verificaram o aumento do carácter hidrofóbico e a melhoria das propriedades mecânicas (KONWAR *et al.*, 2015).

Por sua vez, Huang e colaboradores preparam um biossensor para detecção de dopamina, sensível e confiável, baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de QT/CDs, com o limite de detecção de 11.2 nM (3S/N) (HUANG *et al.*, 2013).

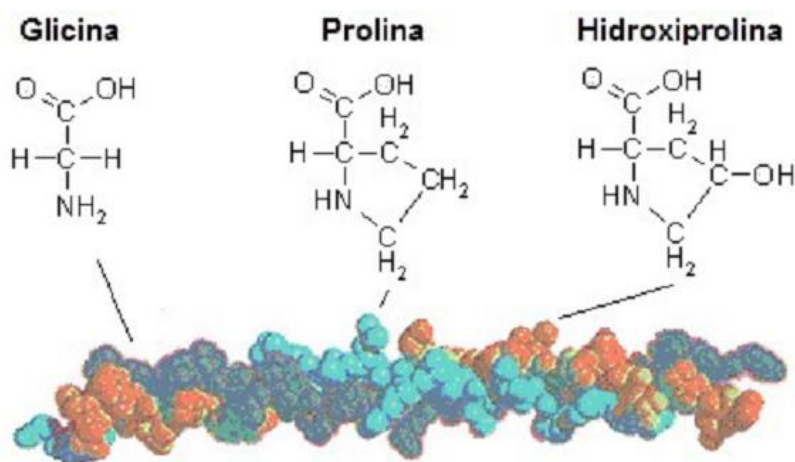
Embora nanocompósitos de QT/CDs já terem sido preparados (SHENG, M., *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2013; KONWAR *et al.*, 2015), o estudo da interface entre estes dois materiais ainda não foi relatado, sendo necessárias novas pesquisas para melhor entendimento.

I.3. Colágeno

O colágeno (CL) é uma proteína fibrosa de origem animal que compõe aproximadamente 30 % das proteínas dentro do corpo e tem a função de contribuir na estrutura dos tecidos dos organismos. Está presente em tecidos conjuntivos do corpo, tais como os ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos (ZUBER *et al.*, 2015; SILVA; PENNA, 2012).

A molécula de CL é composta por três cadeias com a sequência elementar de (Gly-X-Y)_n, onde os resíduos de aminoácidos X e Y são frequentemente prolina (Pro) e 4-hidroxiprolina (Hyp), respectivamente, sendo que as cadeias formam uma estrutura em tripla hélice, estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares entre Gly e Hyp de cadeias adjacentes (Figura I.14) (QI *et al.*, 2015). A glicina (Gly) fica na parte interior da estrutura da tripla hélice e os resíduos de X e Y são totalmente e/ou parcialmente expostos a solventes sendo que, geralmente, as soluções de CL são preparadas utilizando-se ácidos, como H₃PO₄ e CH₃COOH, em baixas concentrações. (QI *et al.*, 2015; ZHANG; SHI, 2011).

Figura I.14 – Modelo molecular do biopolímero CL.



Fonte: SILVA; PENNA, 2012. Adaptado.

O CL é um biopolímero anfótero, uma vez que contém cargas positivas e negativas devido aos grupos funcionais presentes em suas cadeias. Geralmente, em soluções de ácido acético o CL é carregado positivamente. Neste caso, as interações eletrostáticas entre o grupo funcional amina com carga positiva têm um efeito importante na agregação e na conformação estrutural do CL (LI, Y. *et al.*, 2014).

1.3.1. Aplicações do biopolímero colágeno

O CL apresenta propriedades importantes como baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de combinação com outros materiais, adsorção e características biológicas, como fraca antigenicidade. Em adição, pode ser preparado em diversos formatos, incluindo esponjas, géis e folhas, podendo ser utilizado com outros materiais para melhorar suas propriedades (ZUBER *et al.*, 2015; LEE; SINGLA; LEE, 2001). Estas propriedades podem ser ajustadas, logo, geram um grande interesse na utilização deste biopolímero em diversas aplicações como, por exemplo, em biomateriais para medicina, cosméticos e indústrias alimentícias.

No entanto, o CL apresenta algumas limitações como alteração do comportamento celular, hidrofiliabilidade que leva ao inchaço, variação na degradação enzimática, além de sua manipulação ser complexa. Por este motivo, a fim de melhorar as propriedades do CL, estudos foram realizados combinando-o com diferente polímeros para diferentes aplicações (ZUBER *et al.*, 2015). A Tabela I.2 apresenta, resumidamente, algumas aplicações utilizando diferentes polímeros.

Tabela I.2 – Combinação do CL com polímeros para potenciais aplicações.

Compostos	Potenciais aplicações
CL-PVA/HA	Enxerto ósseo e sistemas de liberação de fármacos
CL-QT	Material com propriedades cicatrizantes
PCL/CL	Modificar propriedades hidrofílicas e suporte
CL e gelatina	Sistemas de liberação de fármacos
CL e ácido hialurônico	Aplicações biomédicas e biológicas
CL e nanotubos de carbono de parede simples	Facilitar as aplicações biomédicas e biotecnológicas de nanotubos de carbono de parede simples
QT-CL-gelatina	Material para possíveis aplicações biomédicas
CL-elastina	Regeneração de tecido pulmonar

Fonte: ZUBER *et al.*, 2015. Adaptado.

Além das aplicações apresentadas na Tabela I.2, na literatura, biossensores eletroquímicos baseados em proteínas, como o CL, têm sido amplamente utilizados em diversas áreas, como monitoramento ambiental, indústria de alimentos e diagnóstico médico, devido a sua alta sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, operação simples e baixo custo de fabricação (GUO *et al.*, 2011).

Ning e colaboradores desenvolveram um biossensor a partir de CL e DNA. Primeiramente um material tubular foi preparado através da interação eletrostática e das ligações de hidrogênio feitas entre a tripla hélice de CL e a dupla hélice de DNA, em seguida, a fim de formar um filme, este material foi depositado na superfície de um eletrodo de ouro. Como resultado, obtiveram um biossensor eletroquímico simples e sensível para análise de proteínas, que apresenta uma excelente biocompatibilidade entre o CL e o DNA (NING *et al.*, 2013).

Li e colaboradores desenvolveram nanofibras compostas de nanotubos de carbono, CL e hemoglobina, para aumentar a sensibilidade e o limite de detecção de um biossensor de H₂O₂. Como resposta, o eletrodo modificado com as nanofibras obteve uma alta sensibilidade, baixo limite de detecção e reprodutibilidade (LI, J. *et al.*, 2014).

Devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o CL é um dos principais materiais que podem ser utilizados em aplicações médicas (AN; LIN; BRODSKY, 2016) como, por exemplo, na administração de fármacos e engenharia de tecidos (WALLACE; ROSENBLATT, 2003).

Saska e colaboradores prepararam nanocompósitos baseados em celulose bacteriana e CL, para avaliar a regeneração óssea *in vitro*. Como resultado, os nanocompósitos exibiram uma nanoestrutura homogênea e uma estrutura mais flexível do que as membranas de celulose bacteriana puras, sugerindo que os mesmos podem ser mais fáceis de manipular durante os procedimentos cirúrgicos (SASKA *et al.*, 2012).

Na literatura, diversos compósitos utilizando biopolímeros, como o CL, têm sido relatados e diversos materiais têm sido propostos para melhorar suas funções mecânicas e biológicas a fim de desenvolver novas aplicações em diferentes áreas (RYZHENKOV; KLASSEN; MASALOV, 2014; LI, W. *et al.*, 2014).

Li e colaboradores prepararam filmes à base de CL e nanocristais de celulose. Sabe-se que estudos em cultura de células *in vitro* revelaram que os nanocristais de celulose não têm efeito negativo na morfologia, viabilidade e proliferação celular, possuindo então biocompatibilidade. Como resultado, além do nanocompósito ser biocompatível, houve um

aumento das propriedades termomecânicas, demonstrando que os filmes apresentam um bom potencial para serem aplicados em engenharia de tecidos (LI, W. *et al.*, 2014).

Nanocompósitos utilizando CL são de extrema importância em diversas aplicações, sendo as mais estudadas na área biomédica (SASKA *et al.*, 2012). Sabe-se que as propriedades dos compósitos dependem da interação entre os componentes na interface e das propriedades dos componentes individualmente. (RYZHENKOV; KLASSEN; MASALOV, 2014). Portanto, são necessárias novas pesquisas a fim de entender melhor a interação na interface para ser possível desenvolver novos compósitos eficazes e economicamente viáveis.

I.4. Nanocompósitos

Nanocompósitos são materiais híbridos em que um dos componentes serve de matriz, onde as partículas do outro material são incorporadas, sendo que pelo menos um destes componentes tem dimensões nanométricas. Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica e/ou orgânica (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

O interesse pelos nanocompósitos tem crescido devido a estes materiais tenderem a apresentar melhores propriedades, apresentando frequentemente vantagens como aperfeiçoamentos ópticos, elétricos, magnéticos, fotocatalíticos e mecânicos, quando comparados a qualquer um dos componentes individualmente ou quando comparados aos compósitos convencionais (MORAES; BOTAN; LONA, 2014; JIANG *et al.*, 2015).

Na literatura são descritos diversos nanocompósitos preparados com diferentes componentes e com aplicações distintas, alguns exemplos são nanocompósitos utilizando polímeros como CL, QT, poliamida, polipropileno, polietileno e epóxi combinados com diferentes nanomateriais, como sílica, CDs (BOZETINE *et al.*, 2016), pontos quânticos (WU *et al.* 2011), nanotubos de carbono (AN *et al.*, 2015), nanocristais de celulose (LJUNGBERG; CAVAILLE; HEUX, 2006), entre outros (LUO *et al.*, 2011; LAU *et al.* 2015; IZZATI *et al.*, 2014).

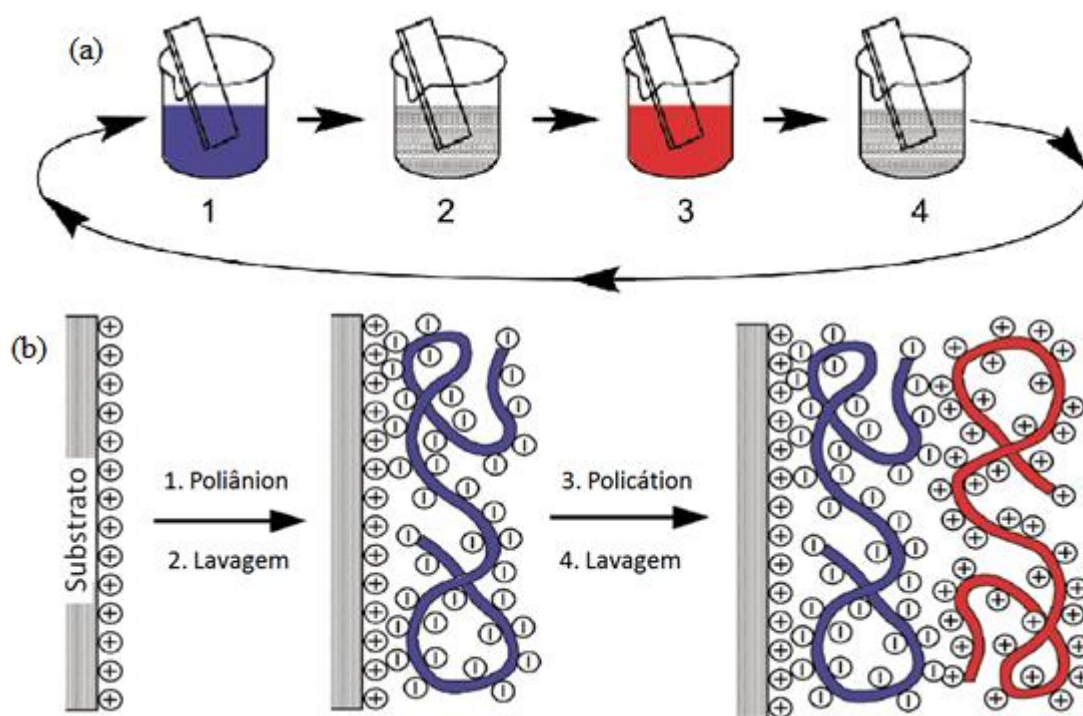
Os métodos de síntese de nanocompósitos são de grande importância, pois busca-se distribuição uniforme das cargas na matriz polimérica e uma boa adesão na interface dos dois componentes (JIANG *et al.*, 2015; ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). Apesar do método de mistura simples fornecer bons resultados e ser uma forma viável e econômica de preparar estes materiais híbridos, cada vez mais estão sendo usados métodos para preparar nanocompósitos com composição e estrutura controladas (ESTEVES;

BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004), pois, sabe-se que a interação entre os componentes na interface do nanocompósito é importante para o estudo de novas aplicações.

I.4.1. Técnica *Layer-by-Layer (LbL)*

A técnica de deposição camada por camada, do inglês *Layer-by-layer (LbL)*, também conhecida como filmes automontados, foi primeiramente desenvolvida por Decher em 1997. Ele propôs uma metodologia para a preparação de filmes finos à base da adsorção sequencial e alternada de monocamadas de dois componentes de forças atrativas na superfície de um substrato sólido a partir de uma solução (Figura I.15) (DECHER, 1997). Filmes finos com componentes desejados podem ser preparados utilizando os tipos apropriados de eletrólitos (SATO, 2011), sendo esta técnica uma alternativa promissora para a preparação de nanocompósitos de alta eficiência (BORGES; MANO, 2014).

Figura I.15 – (a) Esquema representativo da técnica *LbL*, (b) Esquema representativo da técnica *LbL*, em nível molecular, das duas primeiras camadas adsorvidas.



Fonte: DECHER, 1997. Adaptado.

O método apresenta muitas vantagens na preparação de nanocompósitos tais como simplicidade, baixo custo, versatilidade em processos de fabricação de filmes de multicamadas altamente ordenadas usando vários tipos de materiais, distribuição homogênea

da carga sobre a matriz e controle da espessura em escala nanométrica através do controle do número de ciclos de adsorção, controle estrutural em nível molecular e melhor compreensão da interface polímero-nanopartículas (DECHER, 1997; LEE *et al.*, 2015). Além de ser importante para compreender melhor a interface polímero-nanopartículas, é uma técnica simples que não precisa de componentes com alta pureza e equipamentos sofisticados. Desta forma, a técnica *LbL* é uma excelente alternativa para preparação de filmes finos, pela maior facilidade de preparação e estudo das propriedades dos mesmos.

Além de filmes *LbL* tradicionais à base de polímeros de cargas opostas, como por exemplo polianilina e poliestireno sulfonado (RAM *et al.*, 1999), vários filmes automontados foram preparados com nanoestruturas orgânicas e inorgânicas tais como argilas (PODSIADLO *et al.*, 2007a), nanotubos de carbono (LI; JIANG, 2010; TRIGUEIRO *et al.*, 2014), grafeno (LEE *et al.*, 2015), nanocristais de celulose (MESQUITA *et al.*, 2011) e uma grande variedade de nanoestruturas baseadas em metais (SRIVASTAVA; KOTOV, 2008).

Sheng e colaboradores, desenvolveram com sucesso um filme de grafeno e polianilina, através da técnica *LbL*, a partir da deposição alternada de óxido de grafeno e polianilina, seguida pela redução química. Os estudos de voltametria cíclica indicaram que estes filmes finos eram eletroativos, mostrando que são materiais interessantes para dispositivos eletrocromáticos sem a necessidade de utilizar eletrodos convencionais de óxido de índio dopados com estanho (SHENG *et al.*, 2011).

Com o crescente estudo dos *CDs*, novas pesquisas utilizando estas nanopartículas para preparação de nanocompósitos utilizando a técnica *LbL* têm sido relatadas (CHAI *et al.*, 2015).

Gonçalves e colaboradores relataram o desenvolvimento de um sensor de fibra óptica para detecção de íons Hg(II) baseado em um filme de *CDs*/polietilenoimina, preparado pelo método *LbL*. O sensor desenvolvido foi capaz de detectar, seletivamente, concentrações de Hg(II) muito baixas, valores inferiores à μM , com uma sensibilidade superior quando comparada com as soluções de *CDs* (GONÇALVES *et al.*, 2012).

A utilização de *CDs* na preparação de filmes automontados de múltiplas camadas se encontra em fase inicial e, apesar de alguns nanocompósitos terem sido relatados na literatura, o estudo da interface entre os materiais ainda não foi explorado, sendo necessárias novas pesquisas para melhor compreensão e possíveis aplicações.

Capítulo II

Objetivos

II.1. Objetivo Geral

- Preparar e caracterizar filmes automontados através da técnica de deposição camada por camada (do inglês *Layer-by-layer*) utilizando *Carbon Dots*, quitosana e colágeno.

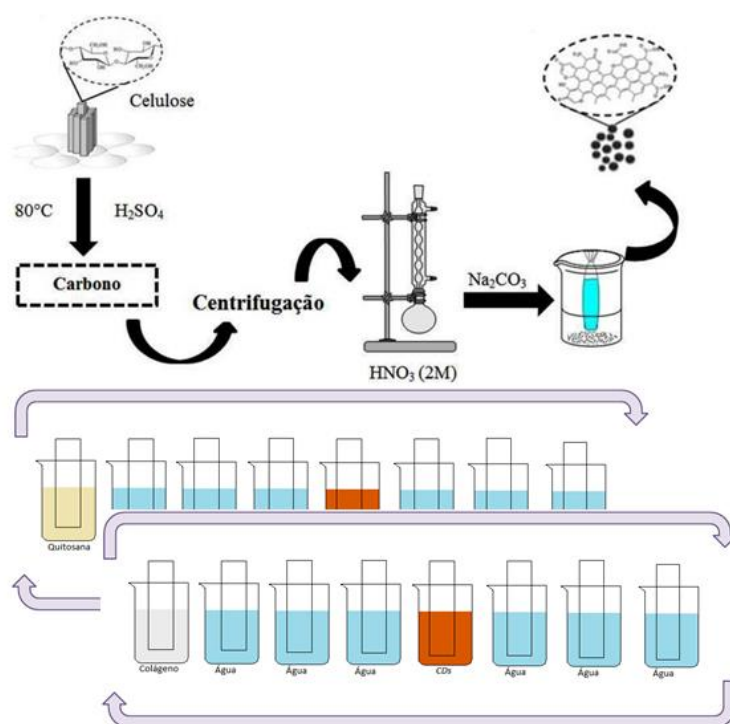
II.2. Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar *Carbon Dots* por meio da desidratação de celulose;
- Preparar filmes automontados utilizando quitosana e *Carbon Dots*;
- Preparar filmes automontados utilizando colágeno e *Carbon Dots*;
- Caracterizar os filmes automontados com diferentes técnicas (Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF), Microscopias Eletrônicas (MET e MET-AR) e de Força Atômica (MFA), Espectroscopia de Ressonância de Plasma de Superfície (RPS, “*Surface Plasmon Resonance*”), Titulação calorimétrica (TC).
- Avaliar as propriedades dos filmes obtidos, tais como espessura, morfologia e interação entre os componentes.
- Investigar o efeito do pH e da força iônica nas propriedades supracitadas dos filmes.

Capítulo III

Parte Experimental

Neste capítulo todos os procedimentos experimentais e técnicas utilizadas para que os objetivos propostos fossem alcançados são descritos. Primeiramente, serão apresentados os procedimentos experimentais utilizados para a preparação dos *Carbon Dots* (CDs) e a



preparação das soluções de quitosana (QT) e colágeno (CL). Em seguida, serão apresentados os procedimentos para a limpeza dos substratos utilizados no crescimento dos filmes e a preparação dos filmes automontados de QT/CDs e CL/CDs. Por fim serão apresentadas as técnicas (Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopias

Eletrônicas e de Força Atômica, Espectroscopia de Ressonância de Plasma de Superfície e Titulação calorimétrica) que foram utilizadas para a caracterização dos *Carbon Dots*, quitosana, colágeno e filmes obtidos.

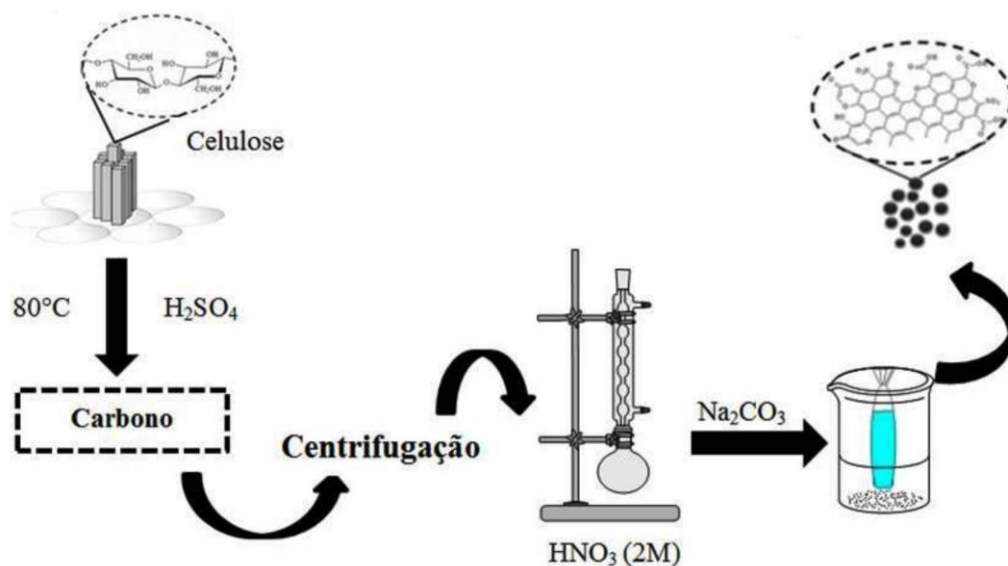
III.1. Materiais e Reagentes

Quitosana (Sigma-Aldrich de massa molar média), colágeno hidrolisado (Vancouros S.A.), algodão (Apolo), ácido acético (Labimpex), ácido sulfúrico (Isofar), ácido nítrico (Synth), carbonato de sódio (Dinâmica), hidróxido de amônio (Synth), peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico (Vetec Química), hidróxido de sódio (Vetec Química), cloreto de sódio (Cromato Produtos Químicos).

III.2. Síntese dos *Carbon Dots*

A preparação dos *CDs* foi realizada seguindo os procedimentos descritos na literatura (ARAÚJO *et al.*, 2016), porém com algumas modificações. Primeiramente, 5,0 g de celulose de algodão foram dispersos em 20 mL de H_2SO_4 à 80 °C. Após 40 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 mL de água e o material de carbono obtido foi lavado e redisperso em uma solução de HNO_3 (2,0 mol/L). Finalmente, a mistura foi submetida ao refluxo durante 12 horas, neutralizada com Na_2CO_3 e dialisada (membrana Sigma) até a condutividade constante ter sido atingida. Tipicamente, as soluções aquosas de *CDs* são obtidas com uma concentração de aproximadamente 1,0 g/L. Na Figura III.1 é mostrado o esquema resumido de todo processo de preparação dos *CDs*.

Figura III. 1 – Esquema representativo da síntese dos *Carbon Dots*.



Fonte: ALVES, 2016a. Adaptado.

III.3. Preparação dos filmes automontados *LbL* por imersão

III.3.1 Preparação da solução de quitosana

1,0 g de QT foi adicionado em 100 mL de uma solução de CH_3COOH 3 %, permanecendo em agitação constante durante 12 horas. Obteve-se uma solução de concentração de 10,0 g/L, sendo o pH final 3,5. A partir desta solução, foram realizadas duas modificações para que fosse possível investigar o efeito das condições das soluções nas características dos filmes.

A primeira modificação foi o ajuste de pH para 5, utilizando-se uma solução de NaOH 2,0 mol/L.

A segunda foi a alteração da força iônica da solução com a adição de NaCl , onde foi adicionado NaCl a fim de se obter uma concentração de 0,1 mol/L de sal.

III.3.2. Preparação da solução de colágeno

10,0 g de CL foram adicionados em 500 mL de uma solução de CH_3COOH 3 %, permanecendo em agitação constante, à uma temperatura de 40 °C, por 48 horas. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo e sua concentração calculada. A concentração da solução obtida foi de 9,0 g/L, sendo o pH final 3,16. Assim como na solução de QT, a solução de CL foi dividida em três partes, sendo uma com pH alterado para 5 e outra com força iônica alterada para 0,1, utilizando-se NaCl .

III.3.3. Preparação dos substratos utilizados na técnica de deposição camada por camada (*LbL*)

As multicamadas de QT/*CDs* e CL/*CDs* foram preparadas em substratos com densidade de carga negativa, lâminas de quartzo e vidro.

Para a preparação dos filmes em lâminas de quartzo, as mesmas foram previamente limpas com duas soluções: a primeira composta de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:5 v/v) e a segunda $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:6), ambas a uma temperatura de 80 °C por dez minutos.

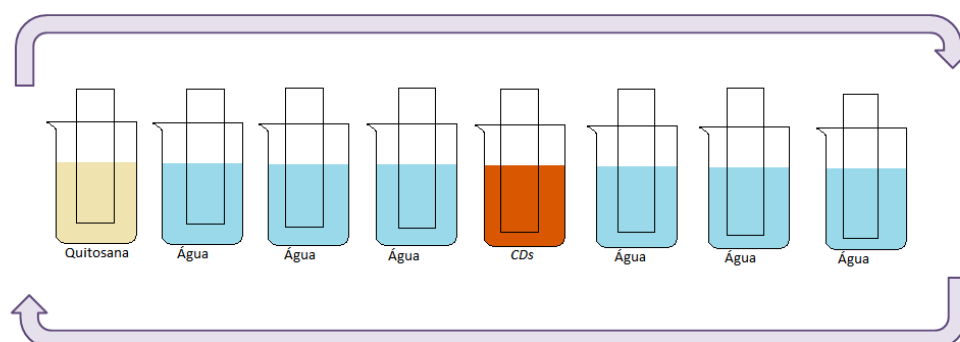
Para a preparação dos filmes em lâminas de vidro, as mesmas foram previamente limpas com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1 v/v) à temperatura ambiente por 1 hora.

III.3.4. Preparação dos nanocompósitos de quitosana e *Carbon Dots*

Os filmes de multicamadas foram preparados manualmente utilizando-se o processo de deposição por imersão sequencial de um substrato, lâminas de quartzo ou vidro, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente na literatura (MESQUITA *et al.*, 2011), com algumas modificações.

As lâminas foram sequencialmente imersas nas soluções de acordo com o seguinte procedimento: (1) imersão do substrato durante 5 minutos em uma solução de QT 1 % (m/v) preparada em uma solução aquosa de ácido acético 3 % (v/v) com pH = 3,5; (2) lavagem com água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ.cm) durante 2 minutos em três béqueres diferentes para retirar o excesso do material; (3) imersão durante 5 minutos em uma solução aquosa de CDs de 1,2 g/L; (4) lavagem com água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ.cm) com o mesmo procedimento descrito em (2). O ciclo completo foi então repetido até que as quantidades desejadas de bicamadas (QT + CDs) fossem depositadas.

Figura III. 2 – Esquema representativo da preparação dos filmes *LbL* QT/CDs.



Em adição, foram preparados mais dois filmes automontados de multicamadas com diferentes soluções de QT: i) solução de QT 1 % (m/v) preparada em uma solução aquosa de ácido acético 3 % (v/v) com o pH = 5, ajustado com uma solução de NaOH 0,2 mol/L; ii) solução de QT 1 % (m/v) preparada em uma solução de ácido acético aquoso 3 % (v/v) na presença de NaCl 0,1 mol/L.

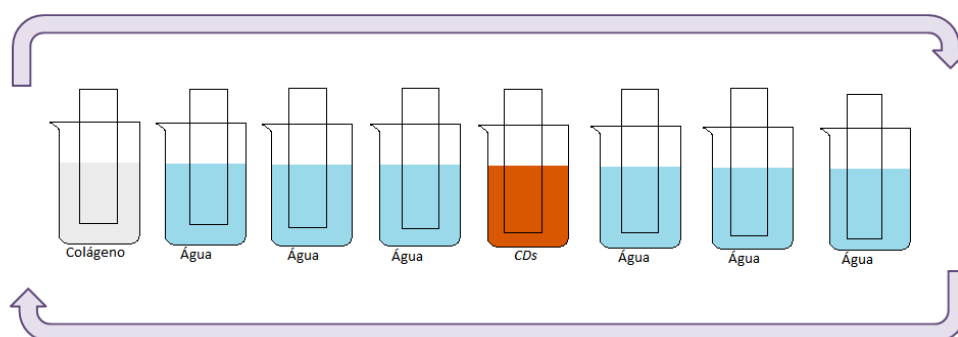
O crescimento dos filmes nas lâminas de quartzo foi monitorado utilizando-se a Espectroscopia UV-Visível, descrita a seguir.

III.3.5. Preparação dos nanocompósitos de colágeno e *Carbon Dots*

Os filmes de multicamadas CL/CDs foram preparados manualmente de forma semelhante aos filmes de QT.

As lâminas foram sequencialmente imersas nas soluções da seguinte maneira: (1) imersão do substrato durante 5 minutos em uma solução de CL 0,9 % (m/v) preparada em uma solução aquosa de ácido acético 3 % (v/v) com $\text{pH} = 3,5$; (2) lavagem com água deionizada (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) durante 2 minutos em três béqueres diferentes para retirar o excesso do material; (3) imersão durante 5 minutos em uma solução aquosa de CDs de 0,84 g/L; (4) lavagem com água deionizada (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) com o mesmo procedimento descrito em (2). O ciclo completo foi então repetido até que as quantidades desejadas de bicamadas (CL + CDs) fossem depositadas.

Figura III. 3 – Esquema representativo da preparação dos filmes *LbL* CL/CDs.



Mais dois filmes automontados de multicamadas foram preparados com diferentes soluções de CL: i) solução de CL 0,9 % (m/v) preparada em uma solução aquosa de ácido acético 3 % (v/v) com o $\text{pH} = 5$, ajustado com uma solução de NaOH 0,2 mol/L; ii) solução de CL 0,9 % (m/v) preparada em uma solução de ácido acético aquoso 3 % (v/v) na presença de NaCl 0,1 mol/L. Assim como nos filmes de QT/CDs, o crescimento foi monitorado utilizando-se a Espectroscopia UV-Visível.

III.4. Caracterização dos materiais

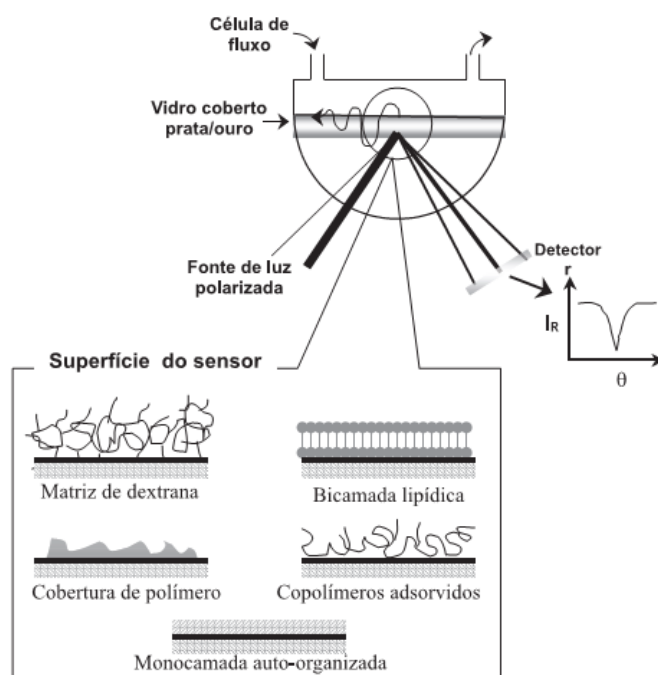
III.4.1. Ressonância de Plasma de Superfície

A técnica de RPS é baseada em propriedades ópticas e pode ser empregada para o estudo da auto-organização e reatividade de monocamadas orgânicas, processos fotoquímicos, degradação de filmes finos, no estudo da adsorção de moléculas biológicas sobre superfícies, entre outros (DAMOS, 2006). O efeito de RPS é uma oscilação da densidade de carga longitudinal ao longo da interface de dois meios, onde um é metal, geralmente ouro, e o outro é um dielétrico (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003). Para a excitação do plasma de

superfície existem diferentes sistemas experimentais desenvolvidos, sendo o mais utilizado o sistema de configuração Kretschmann, devido a apresentar maior sensibilidade e resolução. Neste sistema, durante a reflexão interna total, ocorre a propagação de uma fração da onda incidente na interface que penetra no meio de menor densidade óptica dando origem a um campo eletromagnético evanescente. Ao se estender até o ambiente, esta fração da radiação incidente, se acopla aos elétrons livres oscilantes do metal causando alterações nas proximidades da interface metal-ambiente, que geram uma alteração nas condições de ressonância do sistema. Como resultado, ocorre um deslocamento no ângulo RPS. Deste modo, com o monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do sensor é possível aplicar a RPS para se obter informações sobre velocidade e extensão da adsorção (DAMOS, 2006).

Na Figura III.4 tem-se a representação da configuração de um instrumento típico de RPS, em que uma lâmina de vidro recoberta com prata/ouro é acoplada sob um prisma, através do qual o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, sendo que a luz é refletida para um detector. As soluções dos analitos passam através da célula de fluxo com velocidade e temperatura definidos. A superfície do filme de prata/ouro pode ser modificada originando uma variedade de superfícies para análises (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

Figura III. 4 – Representação de um instrumento de RPS.



Fonte: CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003. Adaptado.

Neste trabalho, as medidas de RPS foram realizadas utilizando-se um instrumento Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance (MP-SPR) SPRNavi 200 (BioNavis®, Finlândia), disponível no Departamento de Química da UFVJM, empregando-se sensores SPR SiO₂ (SPR102-SiO₂), que foram lavados *in situ* no canal de fluxo, com injeções sequenciais de 5 minutos de Hellmanex III® 5 %, álcool isopropílico e água Milli-Q® imediatamente antes de cada experimento. Após cada lavagem, a condição do sensor foi confirmada pelo modo *init scan* em água. O equilíbrio foi confirmado através da medição feita pela corrida com tampão (ácido acético 3 % v/v em água) durante aproximadamente 10 minutos. Os parâmetros de espessura foram obtidos pelo *software* Winspall® (Res-Tec-Ressonante Technologies® GmbH).

III.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos *CDs* foram realizadas usando um microscópio FEI Tecnai G2-Spirit com tensão de aceleração de 200 kV, disponível no Centro de Microscopia da UFMG. Devido ao pequeno tamanho das nanoestruturas de carbono, as imagens foram obtidas após a deposição dos *CDs* em uma grade de transmissão recoberta com um filme polimérico.

III.4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de IVTF dos materiais foram obtidos em um espectrômetro Nicolet 6700 utilizando um espectrômetro com resolução de 2 cm⁻¹, usando a técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) (Smart iTRTM), disponível no Departamento de Química da UFVJM. Todos os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm⁻¹ e são uma média de pelo menos 32 varreduras. Os espectros de IVTF dos filmes *LbL* foram obtidos através da raspagem dos filmes preparados em lâminas de vidro.

III.4.4. Titulação Potenciométrica

Todas as curvas de titulação potenciométrica foram realizadas à 25 °C, sob atmosfera inerte (purga com N₂), utilizando-se eletrodo de pH modelo N6280 (SCHOTT), acoplado a um titulador automático SCHOTT (TitroLine 7000), disponível no Departamento de Química da UFVJM. Uma solução isenta de CO₂ de NaOH foi utilizada como titulante (LIMA; MASINI, 1999; MASINI *et al.*, 1998; MASINI; GODINHO; ALEIXO, 1998).

Para a caracterização dos *CDs* e colágeno, uma vez obtidas as curvas de titulação, a quantidade de grupos ácidos e suas respectivas constantes de ionização são estimadas por meio do ajuste dos dados experimentais resolvendo iterativamente a equação geral (Equação 1), que descreve a titulação de um ácido forte com n ácidos fracos, com um método matemático conhecido como Levenberg-Marquardt (CHAPRA; CANALE, 1998).

$$f(V_i, [H^+]_i) = (V_i - V_{HA_0})Cb + \left\{ [H^+]_i - \frac{K_w}{[H^+]_i} \right\} (V_0 + V_i) - \sum_{j=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})Cb \frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]_i} \quad (1)$$

Nesta equação $[H^+]_i$ é o valor da concentração de hidrogênio, V_i é volume de titulante adicionado, V_0 , o volume inicial presente na célula de titulação, K_w o valor do produto iônico da água na respectiva força iônica, n o número de grupos funcionais estimados e K_{HA_n} e V_{HA_n} , a constante de ionização do ácido fraco e o seu respectivo volume de equivalência. Estes são os parâmetros ajustados durante o ajuste da curva de titulação experimental.

Para determinação do grau de desacetilação da QT, os volumes de equivalência foram obtidos por meio do uso da simples metodologia das derivadas.

III.4.5. Potencial Zeta

As medidas de Potencial Zeta das soluções diluídas de *CDs* (0,002 g/L), QT (0,019 g/L) e CL (0,015 g/L), foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), que se baseia na técnica LDV (Laser Doppler Velocimetry). O equipamento utilizado encontra-se disponível no Departamento de Farmácia da UFVJM.

III.4.6. Viscosidade

As medidas de viscosidade intrínseca das soluções de QT e CL foram realizadas em triplicata utilizando-se um viscosímetro de Ostwald, com um comprimento de capilar de 50 mm à 25 °C. O volume do líquido escoado foi 10 mL. As análises foram realizadas no laboratório LIMPEVALE na UFVJM.

O valor de viscosidade foi obtido através dos seguintes cálculos:

Viscosidade relativa:

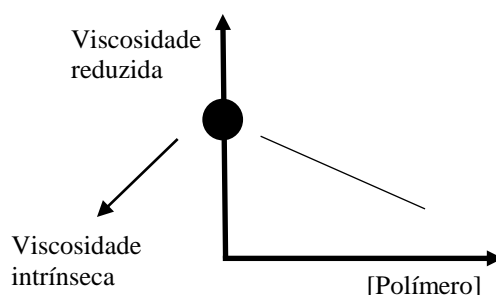
$$\frac{\text{Tempo de escoamento da solução do polímero} - \text{Tempo de escoamento do solvente}}{\text{Tempo de escoamento do solvente}} \quad (2)$$

Viscosidade reduzida:

$$\frac{\text{Viscosidade relativa}}{\text{Concentração da solução do polímero}} \quad (3)$$

Por fim, a partir da extrapolação do gráfico da viscosidade reduzida vs concentração da solução do biopolímero em solução de ácido acético (Figura III.5), foi obtido o valor de viscosidade intrínseca, $[\text{Polímero}] = 0$.

Figura III. 5 – Representação do gráfico de viscosidade.



III.4.7. Espectroscopia Eletrônica UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis foi realizada utilizando-se um espectrômetro Varian Cary 50 UV-Vis, disponível no Departamento de Química da UFVJM. As medições para a determinação da absorvidade molar das soluções de QT, CL e CDs foram realizadas utilizando células de quartzo de 1,0 cm e as medições dos filmes *LbL* QT/CDs e CL/CDs foram feitas a partir de filmes preparados em lâminas de quartzo, sendo o espectro registrado a cada duas bicamadas depositadas. A quantidade de material depositado em cada ciclo foi calculada utilizando-se o processo descrito na literatura (MESQUITA *et al.*, 2011).

III.4.8. Microscopia de Força Atômica

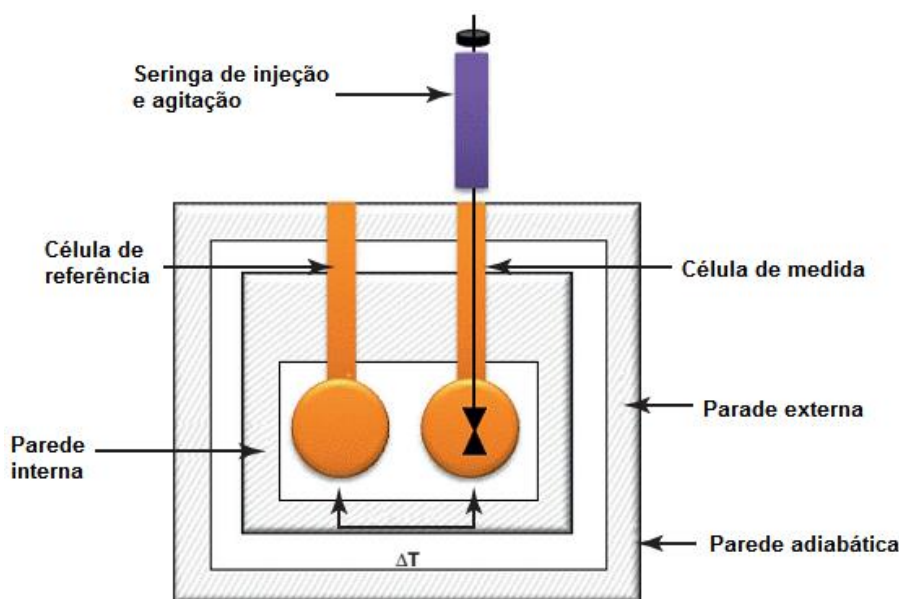
As imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) foram obtidas utilizando-se um instrumento comercial Pico Plus, disponível na UFMG.

III.4.9. Titulação Calorimétrica

A calorimetria de titulação isotérmica é uma das técnicas mais empregadas para descrição termodinâmica de diferentes sistemas. Por meio desta técnica é possível obter a isoterma de interação, que possibilita a descrição termodinâmica de um sistema com a obtenção de parâmetros termodinâmicos como entalpia (H), energia de Gibbs (G), entropia (S), constante de interação (K) e pode fornecer evidências sobre o mecanismo de interação do sistema em estudo (VERLY, 2010; BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica são relativamente simples. O equipamento consiste em um sistema adiabático, composto por uma célula de medida e outra de referência, onde o titulado fica contido na célula de medida e o titulante é injetado automaticamente nesta célula por uma seringa, que também atua como um agitador homogeneizando o sistema na célula de medida (Figura III.5). O calor absorvido ou liberado pela interação é medido empregando-se um sistema de resposta eletrônico que mantém as células a uma temperatura constante (VERLY, 2010; BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

Figura III. 6 – Representação do equipamento de calorimetria de titulação isotérmica.



Fonte: BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012. Adaptado.

O modelo matemático mais comum utilizado para descrever as isotermas de titulação calorimétricas é denominado de Isoterma de Wiseman (WISEMAN *et al.*, 1989; VERLY, 2010) e pode ser observado na Equação 4.

$$\overline{\Delta_{comp}H} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{tot}} \right)_P = \Delta_{int}H^\circ V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1-X_R-r}{2\sqrt{(1+X_R-r)^2-4X_R}} \right] \quad (4)$$

Esta equação descreve uma curva sigmóide e relaciona a entalpia molar parcial de complexação ($\Delta_{comp}H = dQ/d[X]$) a pressão constante, com a razão molar do titulante (X) e do titulado (M) ($X_R = [X]_t/[M]_t$) em qualquer ponto durante o curso da titulação. O parâmetro r é uma variável de composição ($r = 1/[M]_t \cdot K_{eq}$) e os parâmetros $\Delta_{int}H^\circ$, V_0 e K_{eq} são, respectivamente, entalpia molar padrão de complexação, volume efetivo da solução na cela de titulação e constante de equilíbrio.

Com o valor de K_{eq} obtido, é possível calcular a variação da energia-livre de Gibbs padrão ΔG° do processo por meio da Equação 5 (ATKINS; JONES, 2006). Com o valor de $\Delta_{int}H^\circ$ e usando-se a Equação 6 (ATKINS; JONES, 2006) é possível calcular a entropia.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k_{eq} \quad (5)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6)$$

Neste trabalho, as titulações calorimétricas foram realizadas utilizando um Microcalorímetro VP-ITC da Malvern, a 298,15 K. O equipamento se encontra disponível no Departamento de Química da UFVJM.

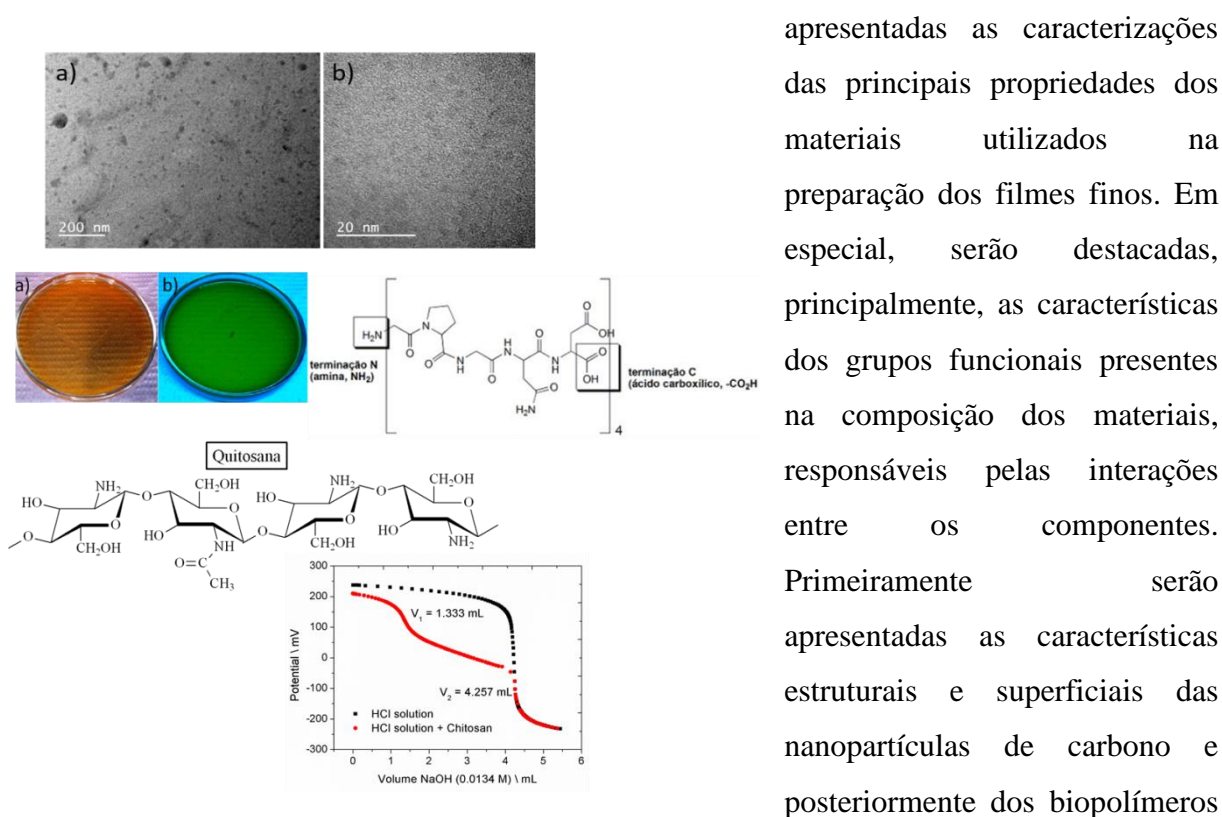
Antes da utilização do equipamento, as soluções foram desgaseificadas em acessório Termovac – Malvern aplicando-se vácuo (5 minutos) para eliminar bolhas de ar. Os experimentos foram registrados pela titulação de *CDs* em CL, nas concentrações de 0,21 g/L e 2,25 g/L, respectivamente. A solução de *CDs* foi previamente solubilizada em água, sendo posteriormente a água evaporada em estufa à 70°C e em seguida diluído em ácido acético. Foram utilizados três meios diferentes para a titulação dos *CDs* em CL, sendo: (i) ácido acético 3 % em pH = 3,2; (ii) ácido acético 3 % pH = 5; e (iii) ácido acético 3 % em pH = 3,2 com NaCl 0,1 mol/L. Cada experimento de titulação consistiu-se em 25 injeções sucessivas de titulante (*CDs*) na cela de reação carregada com 1,488 mL de solução de CL, em intervalos de 250 segundos. A primeira injeção de 1 µL foi descartada para eliminar efeitos de difusão

de material da seringa para a cela calorimétrica. Todas as demais injeções foram realizadas com um volume constante de 10 μL e o tempo de injeção foi de 20 segundos. Os experimentos de diluição dos *CDs* foram realizados por injeções de solução de *CDs* em solução de: (i) ácido acético 3 % em $\text{pH} = 3,2$; (ii) ácido acético 3 % $\text{pH} = 5$; e (iii) ácido acético 3 % $\text{pH} = 3,2$ com NaCl 0,1 mol/L. Os dados de cada experimento foram analisados através do *software* do próprio calorímetro (Microcal Origin 7.0 para ITC), após a subtração do respectivo experimento de diluição.

Capítulo IV

Caracterização dos *Carbon Dots*, Quitosana e Colágeno

O sucesso na preparação e compreensão das propriedades dos filmes finos automontados baseados em nanocompósitos está diretamente relacionado ao conhecimento das características morfológicas e superficiais dos seus componentes. Neste capítulo serão



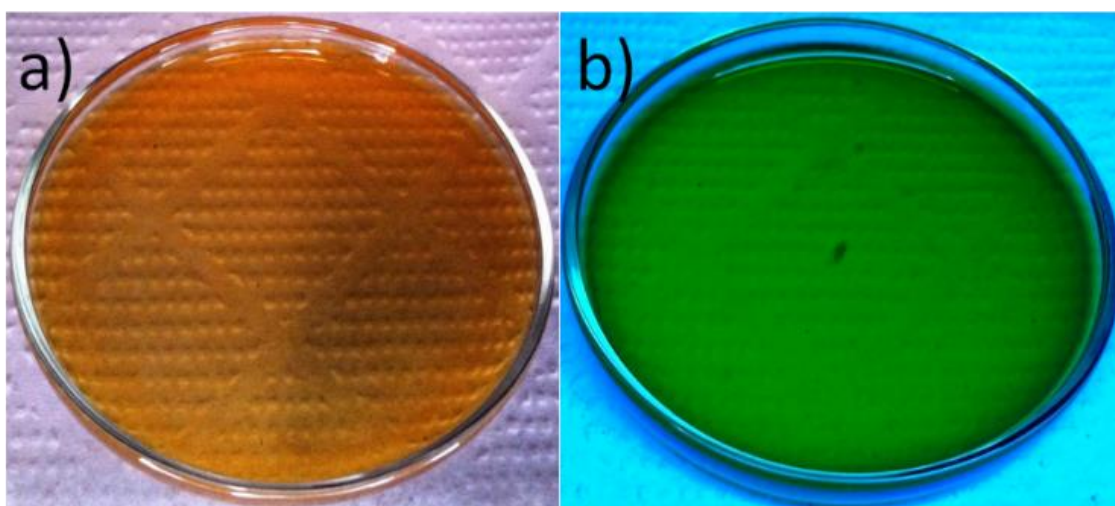
apresentadas as caracterizações das principais propriedades dos materiais utilizados na preparação dos filmes finos. Em especial, serão destacadas, principalmente, as características dos grupos funcionais presentes na composição dos materiais, responsáveis pelas interações entre os componentes. Primeiramente serão apresentadas as características estruturais e superficiais das nanopartículas de carbono e posteriormente dos biopolímeros QT e CL. Para ambos, serão discutidos, principalmente, as propriedades ácido-base das estruturas poliméricas uma vez que estes grupos funcionais são os principais responsáveis pela interação com as nanoestruturas de carbono que levarão a formação dos filmes.

A caracterização estrutural e superficial dos materiais usados na preparação dos nanocompósitos é essencial na compreensão das variáveis que governam as propriedades dos filmes automontados.

IV.1. Caracterização dos *Carbon Dots*

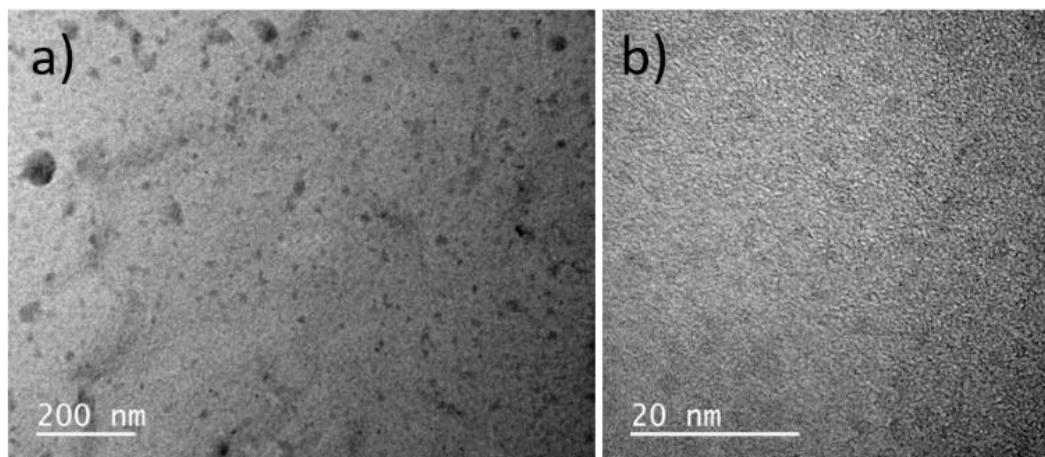
A principal característica que distingue os *CDs* e as nanoestruturas com propriedades ópticas baseadas em nanografeno são suas propriedades fluorescentes, sendo esta propriedade a principal evidência da presença das nanopartículas em solução. Na Figura IV.1 são mostradas as imagens digitais obtidas para as suspensões das nanoestruturas sob luz ambiente (Figura IV.1a) e luz UV, $\lambda = 254$ nm (Figura IV.1b). Sob luz UV os *CDs* presentes na solução emitem uma intensa radiação verde do espectro eletromagnético.

Figura IV.1 – Imagens das soluções de *CDs* sob condições ambiente (a) e (b) luz UV.



Tipicamente, as nanoestruturas fluorescentes de carbono apresentam tamanhos inferiores a 10 nm. Na Figura IV.2 são mostradas as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (MET-AR) obtidas para os *CDs* preparados a partir da desidratação ácida de celulose. Na Figura IV.2a pode ser verificada a presença de uma grande quantidade de partículas sobre o filme polimérico que recobre o suporte metálico utilizado na obtenção das imagens. Com o aumento da magnificação (Figura IV.2b), apesar do baixo contraste, é possível observar que as partículas exibem uma morfologia quase esférica com um diâmetro médio de $2,7 \pm 0,5$ nm (ALVES *et al.*, 2016b).

Figura IV.2 – Imagem de MET dos CDs preparados a partir de desidratação ácida.



Em trabalhos anteriores foram observadas, em algumas nanoestruturas, a presença dos planos 002 de estruturas grafíticas (ARAÚJO *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2016b).

Uma vez que durante a reação com H_2SO_4 , que desidrata a estrutura da celulose levando a aromatização/carbonização do material com introdução de grupos funcionais sulfurados e a posterior reação de oxidação com HNO_3 , que ataca a superfície do carbono obtido corroendo sua estrutura e introduzindo mais estruturas químicas, espera-se a presença de grandes quantidades de grupos funcionais oxigenados na superfície dos CDs usados neste trabalho. As propriedades de superfície dos CDs preparados com esta metodologia já foram caracterizadas com diferentes técnicas, incluindo análise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica acoplada a um espectrômetro de massas (TG-MS) (ALVES *et al.*, 2016b). Aqui serão apresentados somente os resultados obtidos com espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e titulação potenciométrica.

Na Figura IV.3 é mostrado o espectro IVTF obtido e na Tabela IV.1 são mostradas as principais bandas de absorção características de grupos funcionais encontrados em materiais de carbono. O espectro apresenta várias bandas de absorção localizadas nas regiões de 2750 a 3750 cm^{-1} e 900 a 1800 cm^{-1} . Conforme a Tabela IV.1 as absorções localizadas acima de 2750 cm^{-1} são características de estiramento O-H de diferentes grupos funcionais como álcoois e carboxílicos. Nesta mesma região, especificamente ao redor de 2900 cm^{-1} , pode ser verificado fracas absorções (Figura IV.3a) devido aos estiramentos simétricos e assimétricos de ligações C-H (BARBOSA, 2007).

Figura IV.3 – (a) Espectro IVTF obtido para os *CDs* preparados a partir da desidratação/oxidação de celulose de algodão. (b) Espectro IVTF obtido para os *CDs* em frequências mais baixas.

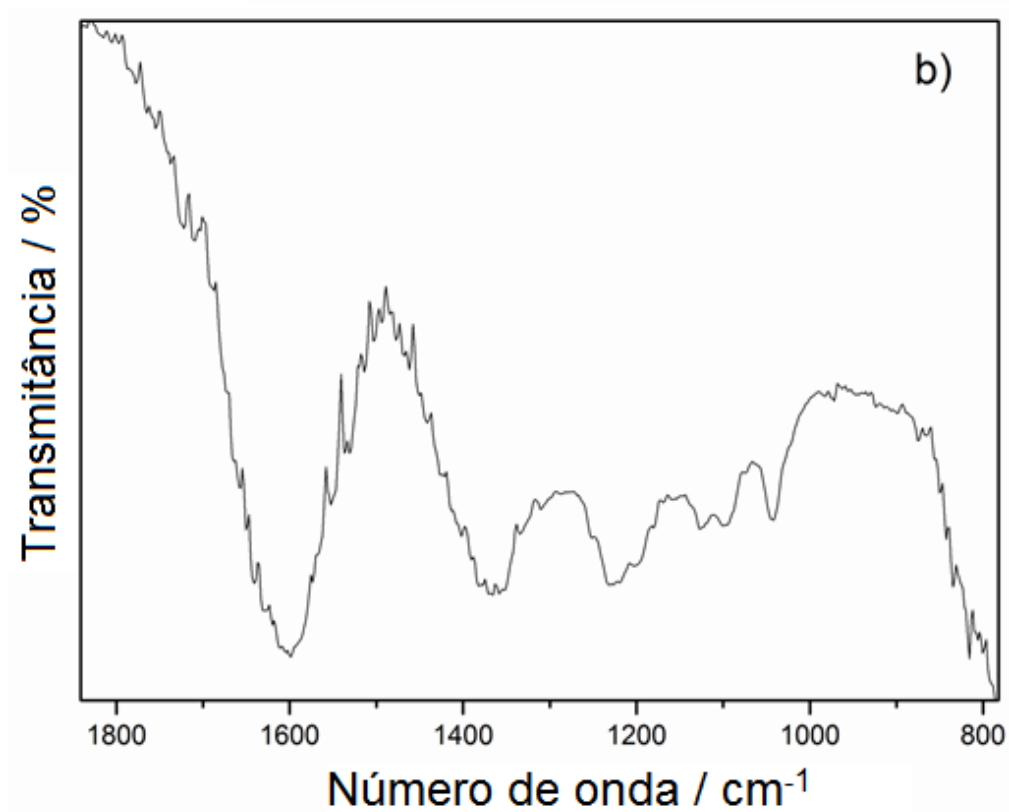
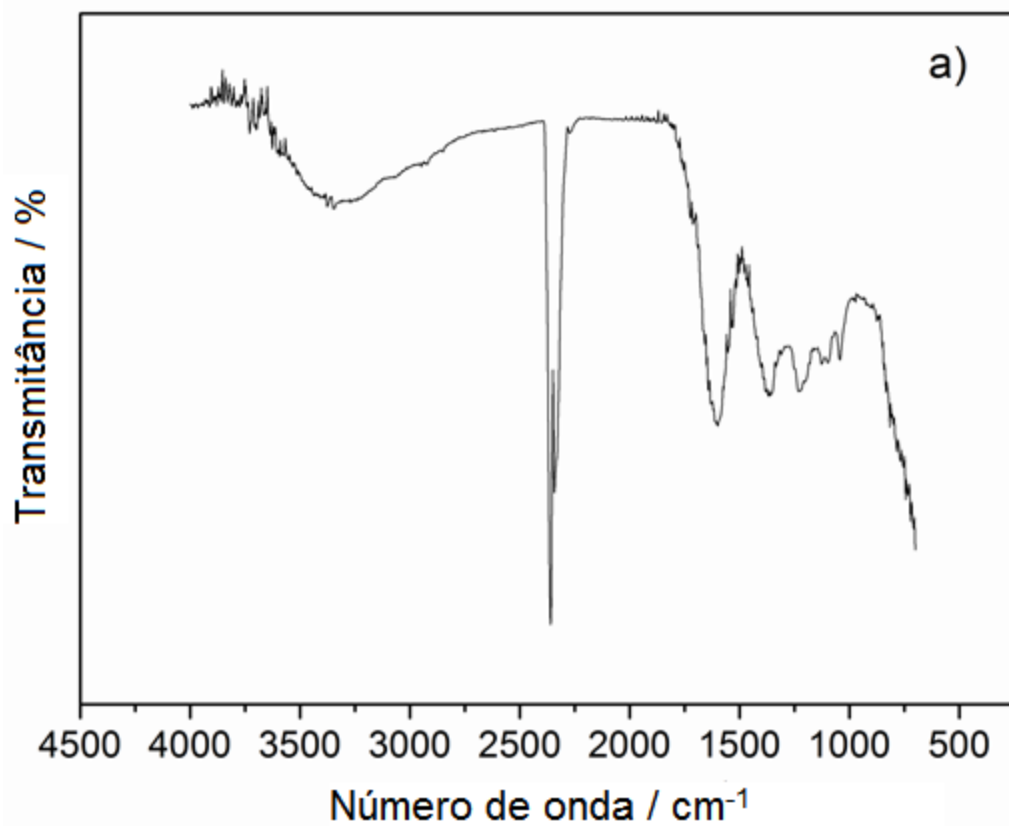


Tabela IV.1 – Região de absorção dos principais grupos oxigenados presentes em materiais carbonosos.

Grupo funcional	Região de absorção (cm ⁻¹)		
	1000-1500	1500-2050	2050-3700
C-O de éteres (estiramento)	1000-1300		
Álcoois	1049-1276		3200-3640
Fenóis:			
C-OH (Estiramento)	1000-1220		
O-H	1160-1200		2500-3620
Carbonatos, carbonatos-carboxílicos	1100-1500	1590-1600	
C=C aromático (estiramento)		1585-1600	
Quinonas		1550-1680	
Ácidos carboxílicos	1120-1200	1665-1760	
Lactonas	1160-1370	1675-1790	
Anidridos carboxílicos	980-1300	1740-1880	
C-H (estiramento)			2600-3000

Fonte: FIGUEIREDO *et al.*, 1999. Adaptado.

Na região de frequências mais baixas a comprovação da presença de alguns grupos funcionais pode ser confirmada (Figura IV.3b). Os grupos carboxílicos, por exemplo, além de gerarem bandas de estiramento O-H bem largas, como a mostrada na Figura IV.3a, apresentam absorção ao redor de 1700 cm⁻¹, característica do estiramento C=O. Aqui, devido à grande heterogeneidade química da superfície do material, as bandas de carbonilas de diferentes grupos funcionais (carboxílicos, ésteres e quinonas) se sobrepõem aos estiramentos C=C, gerando uma banda relativamente larga, centrada em 1600 cm⁻¹, que se inicia em 1500 cm⁻¹ e alonga-se até 1800 cm⁻¹ (Figura IV.3b). Em adição, as várias absorções localizadas entre 1000 e 1400 cm⁻¹, características principalmente de estiramento C-O e deformação C-H, podem ser originadas de diferentes grupos funcionais, incluindo grupos -NO₂, que podem estar presentes devido a oxidação do carbono com HNO₃ (ALVES *et al.*, 2016b).

A técnica IVTF, permite uma caracterização qualitativa da superfície das nanoestruturas de carbono. Entretanto, muitos dos grupos funcionais oxigenados, como fenólicos e carboxílicos, apresentam acidez de Brønsted. A titulação potenciométrica é útil na quantificação destes grupos funcionais ácidos. A metodologia utilizada neste trabalho já foi

comprovada na caracterização de diferentes materiais de carbono (MESQUITA; MARTELLI; GORGULHO, 2006; GORGULHO *et al.*, 2008). Neste trabalho são mostrados somente o logaritmo da constante de acidez, pKa, e a quantidade correspondente de cada um dos grupos funcionais ácidos presentes na superfície dos *CDs*. Estes resultados são mostrados na Tabela IV.2.

Tabela IV.2 – Quantidade de grupos funcionais ácidos determinados por titulação potenciométrica e valores de potencial ζ obtidos para os *CDs* em diferentes condições em solução aquosa.

Grupos funcionais ácidos	<i>CDs</i>	
	pKa	Grupos ácidos / mmol/g
Carboxílico	3,29	1,71
Carboxílico	4,62	1,23
Lactona	6,03	0,59
Lactona	7,64	0,20
Fenol	9,22	0,81
Total de grupos funcionais ácidos		4,55
Potencial ζ / mV	$-47 \pm 17^*$	
	$-8,9 \pm 1,2^{**}$	

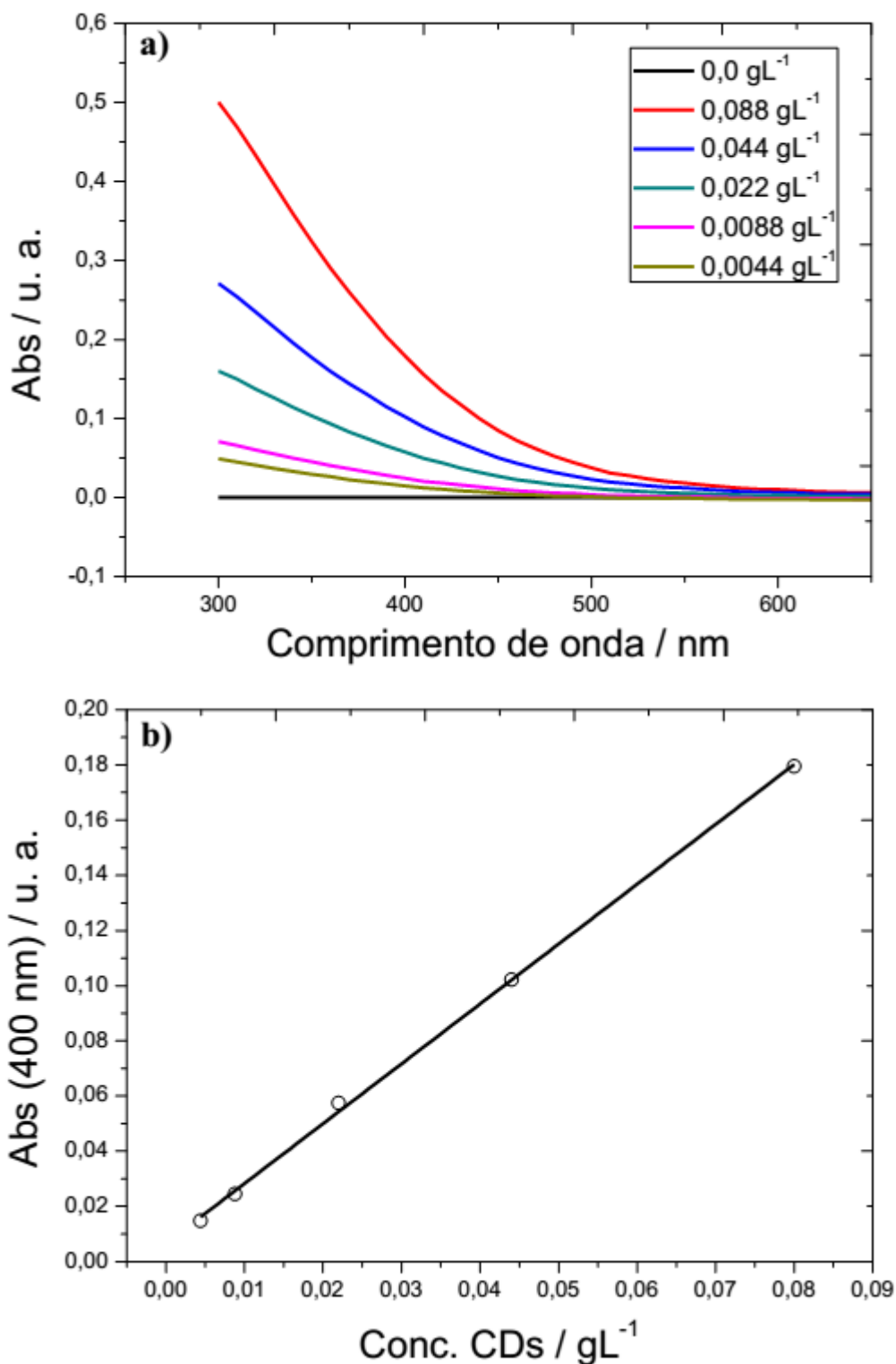
* pH = 5,4; ** pH = 5,4 e força iônica de 0,1 mol/L.

Com base nos resultados obtidos (Tabela IV.2), concluiu-se que os *CDs* preparados são altamente oxidados (total de grupos funcionais ácidos = 4,5 mmol/g), com aproximadamente 63 % dos grupos funcionais com pKa característico de grupos carboxílicos. Em pH de aproximadamente 6, a presença destes grupos funcionais ácidos, especialmente os grupos carboxílicos, é suficiente para resultar em um potencial $\zeta = -47 \pm 17$ mV. Este potencial ζ é superior quando a força iônica está elevada (Tabela IV.2).

É importante destacar que a presença de grupos com cargas (e a densidade de cargas) são parâmetros importantes para a estabilização da solução e para algumas características do crescimento do filme, tais como forças de coesão e rugosidade da superfície dos filmes preparados (PEARSON, 1988; MESQUITA *et al.*, 2011). A principal característica que distingue os *CDs* dos outros materiais de carbono são suas propriedades ópticas.

Como mostrado anteriormente, os *CDs* preparados aqui apresentam forte emissão na região verde do espectro eletromagnético. As propriedades de absorção das soluções de *CDs* com diferentes concentrações são apresentadas na Figura IV.4a.

Figura IV.4 – (a) Espectros UV-Vis obtidos para suspensões de *CDs* com diferentes concentrações em pH = 6. (b) Absorbâncias em 400nm em função das concentrações das soluções de *CDs*.



Como pode ser verificado, os *CDs* absorvem em uma ampla faixa de comprimento de onda, iniciando em aproximadamente 500 nm e intensificando cada vez mais com o aumento da energia da radiação. A origem das transições eletrônicas nos *CDs* é altamente complexa (SILVA; GONÇALVES, 2011). Em geral, tem se atribuído as transições às estruturas gráficas e aos grupos funcionais superficiais. Tipicamente, as transições $\pi\text{-}\pi^*$ de ligações C=C e $n\text{-}\pi^*$ de ligações C=O (LIM; SHEN; GAO, 2015).

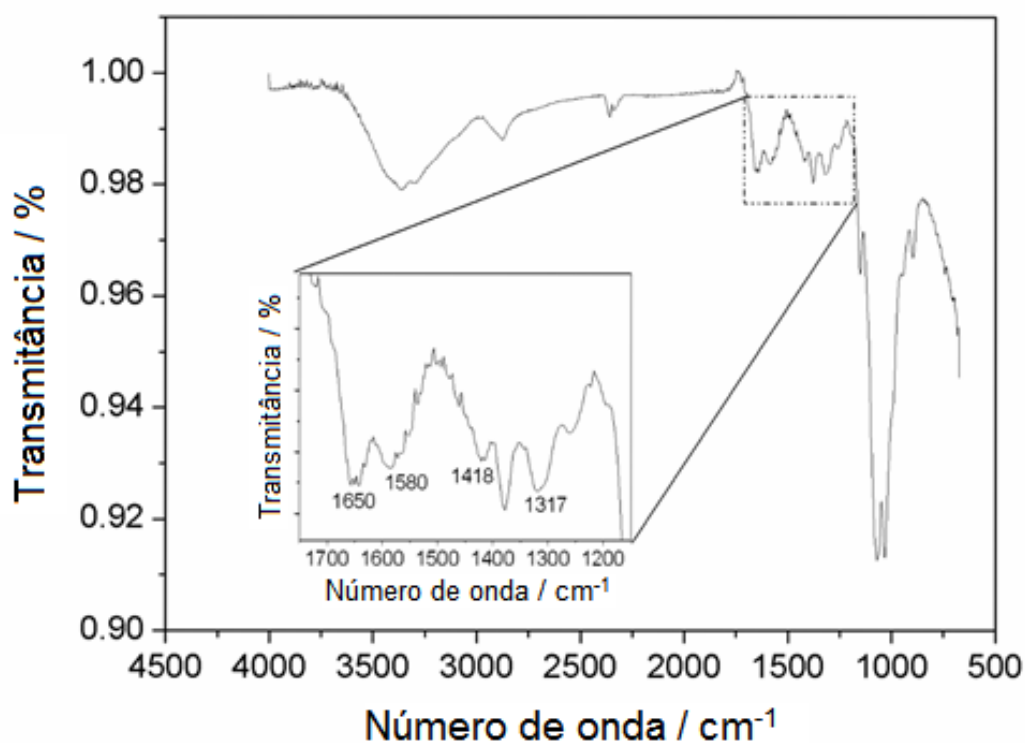
Uma vez que os valores de absortividade molar (ϵ) podem ser usados na quantificação dos materiais que compõem os filmes automontados (MESQUITA *et al.*, 2011), o valor de ϵ foi determinado em 400 nm (Figura IV.4b), este valor de absorção foi escolhido devido às propriedades dos materiais que compõem os filmes. O valor obtido foi de 0,23 m²/g. Detalhes da manipulação de unidades podem ser encontrados no material em anexo.

IV.2. Caracterização da quitosana

A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na crosta terrestre, extraída principalmente da carapaça de crustáceos (HEIN *et al.*, 2008). A quitosana é o seu principal derivado sendo obtida através de uma reação de desacetilação em meio alcalino (Figura I.12). A quitosana é um copolímero formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose (N-acetil-glucosamina) e 2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina) unidas por ligações do tipo $\beta(1\text{-}4)$ e, por definição, é caracterizada quando apresenta-se solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos e com um grau de desacetilação (GD) maior que 60 % (KUMAR, M. N. V. R, *et al.*, 2004; CAMPANA; SIGNINI, 2001).

Na Figura IV.5 é apresentado o espectro na região do infravermelho obtido para a amostra de QT. O espectro na região do infravermelho da QT apresenta três regiões importantes de absorção. A primeira, localizada ao redor de 1100 cm⁻¹ é proveniente da estrutura sacarídea do polímero. A segunda é devido à deformação N-H dos grupos amida e amina localizados ao redor de 1580 cm⁻¹ e ao estiramento C=O, proveniente de grupos acetamido localizados em torno de 1650 cm⁻¹. A terceira localiza-se na região de alta frequência devido ao estiramento O-H e N-H.

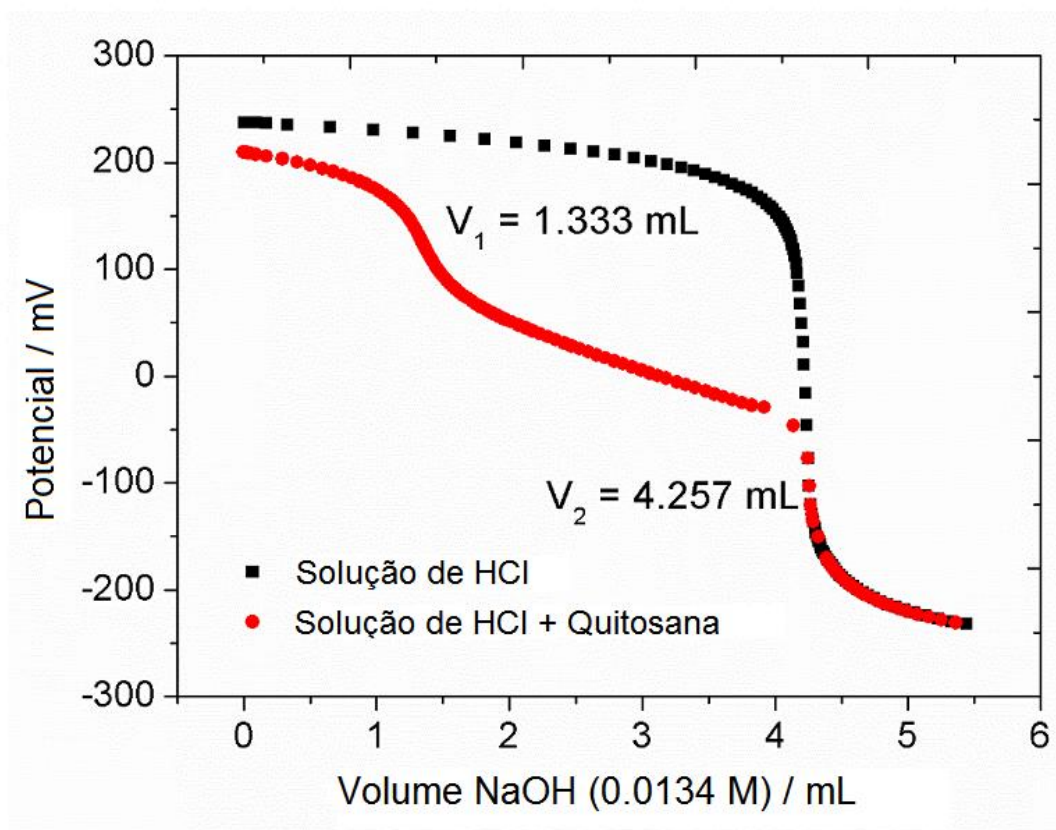
Figura IV.5 – Espectro de IVTF obtido para a QT.



A caracterização do biopolímero QT baseia-se principalmente na determinação do seu grau de acetilação ou desacetilação (com desacetilação maior que 60 % o material é denominado QT, abaixo deste valor, ainda é considerado quitina). Para tal caracterização, diferentes técnicas têm sido utilizadas (KASAAI, 2009).

Neste trabalho a estimativa do grau de desacetilação (GD) do biopolímero QT foi realizado com duas técnicas, IVTF e titulação potenciométrica. A Figura IV.5 e a Figura IV.6 mostram, respectivamente, o espectro de IVTF e a curva de titulação potenciométrica obtidos para a amostra de QT.

Figura IV.6 – Curvas de titulação potenciométrica de 20 mL de uma solução de HCl (0,0028 M) e 20 mL de uma solução de HCl (0,0028 M) / 9,1 mg de QT. Concentração de NaOH 0,0134 M (titulante).



Para determinar o grau de acetilação (GA) da amostra pela técnica de IVTF utilizou-se a equação descrita por Brugnerotto e colaboradores (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001) (Equação 1).

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133.AD \quad (1)$$

Onde $\frac{A_{1320}}{A_{1420}}$ representa a razão entre os valores de absorbância para as bandas de infravermelho localizadas em 1320 e 1420 cm^{-1} . Estas bandas são escolhidas devido à: (i) 1320 cm^{-1} referente ao CH_3 , pois quanto maior o GD menor é o valor de absorção; e (ii) 1420 cm^{-1} referente ao CH_2 que tem um valor fixo, pois não altera com a reação.

Por outro lado, com base na curva de titulação potenciométrica obtida, o grau médio de desacetilação pode ser estimado utilizando-se a Equação 2 (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

$$\%GD = \frac{16,1.[NaOH].(V_2 - V_1)}{m} \quad (2)$$

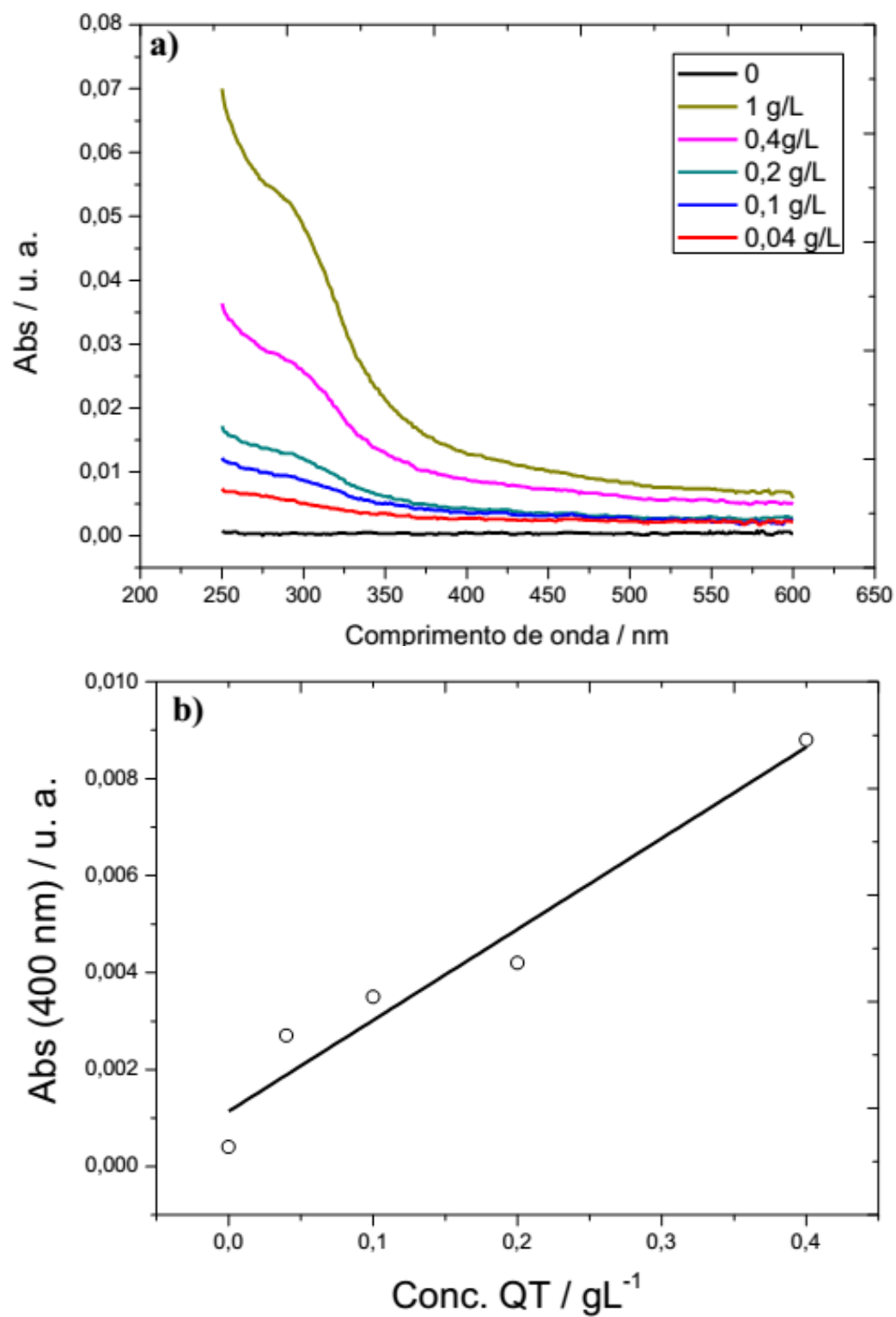
Sendo que V_1 é o volume de base utilizada para neutralizar o excesso de HCl (mL); $(V_2 - V_1)$ é o volume de base usada para a neutralizar os grupos ácidos da QT (mL); $[NaOH]$ é a concentração da base utilizada, e m é a massa da amostra de QT.

O %GD obtido a partir dos espectros de IVTF e de titulação potenciométrica foram de 75 e 69 %, respectivamente.

A QT apresenta, principalmente, grupos amino com propriedades ácido-base. Por meio da titulação potenciométrica, foi determinado um total de grupos funcionais ácidos de 4,3 mmol/g com um pKa estimado em 6,2.

A QT é composta de dois grupos cromóforos UV, N-acetil-glucosamina e glucosamina, que contribuem com o aumento da absorbância total do material (WU; ZIVANOVIC, 2008; LIU *et al.* 2006). Na Figura IV.7a é mostrado o espectro na região UV-Vis da solução de QT em diferentes concentrações. A partir dos espectros, os valores de absorvidade molar (ϵ) em 400 nm foram obtidos (Figura IV.7b). Sabe-se que os valores de ϵ podem ser usados na quantificação dos materiais que compõem os filmes automontados (MESQUITA *et al.*, 2011), sendo o valor encontrado para a QT de $2,2 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{g}$. Detalhes da manipulação de unidades podem ser encontrados no material em anexo.

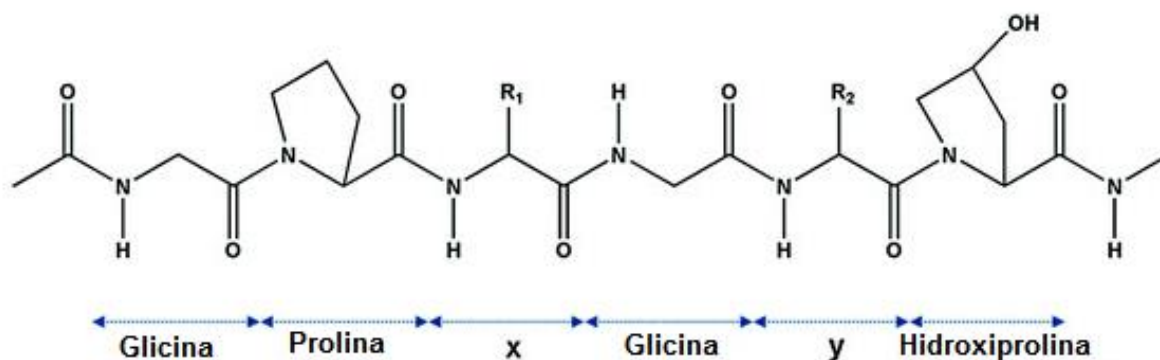
Figura IV.7 – (a) Espectro UV-Vis da solução de QT em ácido acético 1 % (v/v); (b) Absorbância em 400 nm em função da concentração da solução de QT.



IV.3. Caracterização do colágeno

O CL tem uma configuração de três polipeptídeos, em sua maior parte glicina, prolina e hidroxiprolina, os quais encontram-se unidos em uma tripla hélice estabilizada por ligação de hidrogênio entre o grupo -NH da glicina e o grupo C=O de outra cadeia polipeptídica (FRIESS, 1998; YANG *et al.*, 2009). Na Figura IV.8 têm-se a representação da estrutura molecular do CL (SAMPATH *et al.*, 2016).

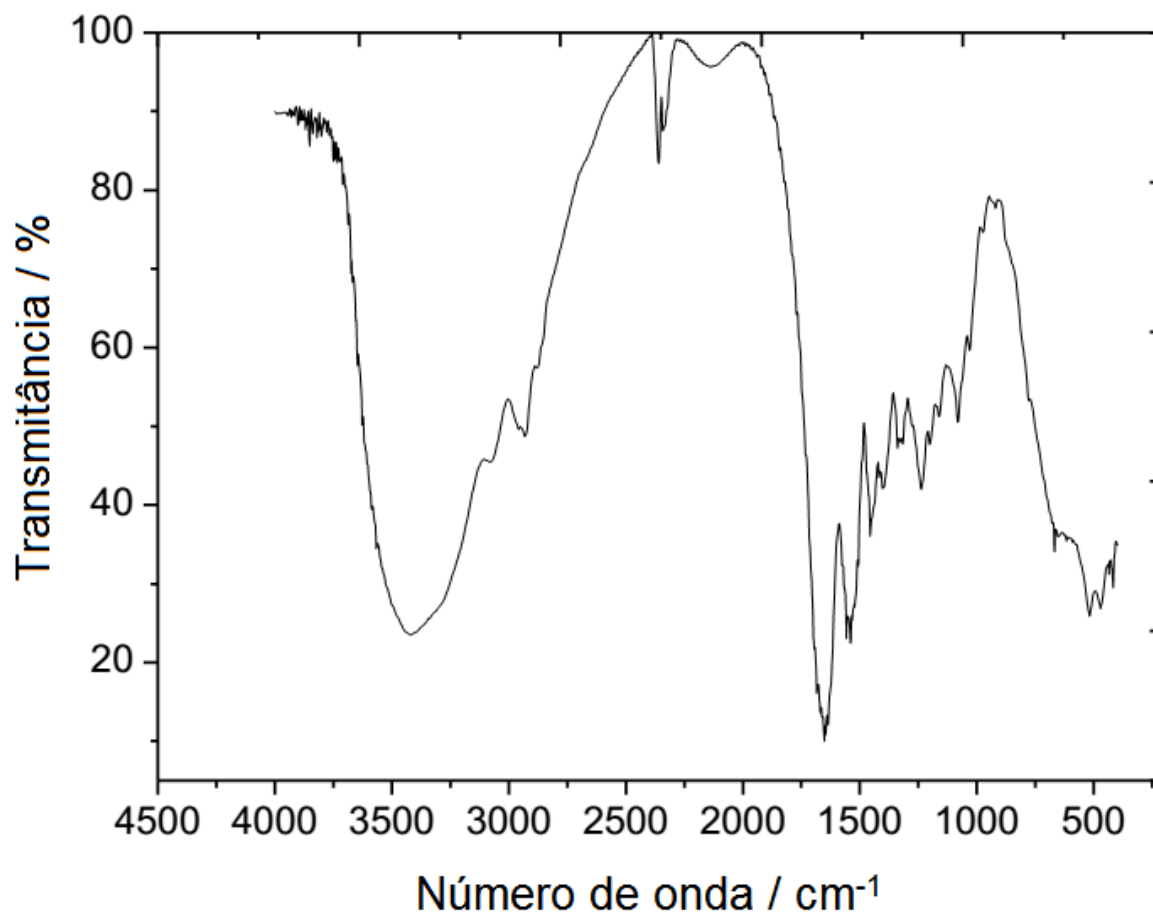
Figura IV.8 – Estrutura molecular do biopolímero CL.



Fonte: SAMPATH *et al.*, 2016. Adaptado.

Na Figura IV.9 é apresentado o espectro na região do infravermelho obtido para a amostra de CL. O espectro apresenta absorções típicas de proteínas. Pode-se observar bandas em aproximadamente: (i) 1100 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} , indicando, respectivamente, estiramentos C-O de álcoois e estiramentos C-N de amidas; (ii) 1440 cm^{-1} , características de dobramentos CH_2 ; (iii) 1650 cm^{-1} absorções que indicam a presença de estiramentos C=O, referentes às ligações peptídicas; (iv) 1550 cm^{-1} , indicando dobramentos N-H de amidas, sugerindo grupos -NH presentes em toda a cadeia e em sua terminação; (v) 2900 cm^{-1} , características de estiramentos C-H; (vi) 3070 cm^{-1} , referente a estiramentos C-H de carbono sp^2 , que se origina de algum aminoácido com anel aromático, por exemplo o imidazol; e (vii) absorções na região em torno de 3250 cm^{-1} , que indicam estiramentos O-H e N-H (BARBOSA, 2007; TONHI; PLEPIS, 2001).

Figura IV.9 – Espectro de IVTF obtido para a CL.



O colágeno utilizado neste trabalho foi caracterizado (MESQUITA *et al.*, 2011) e os dados de titulação potenciométrica são apresentados na Tabela IV.3. De um modo geral, os valores de pKa obtidos estão de acordo com os aminoácidos presentes nas estruturas. Grupos com pKa 2,992 e 4,389 são atribuídos aos grupos β e γ -carboxílicos que correspondem aos grupos presentes na cadeia lateral dos ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente. O valor de pKa 6,279 corresponde aos grupos imidazol de histidina, sendo os valores de pKa 7,797 e 9,649 correspondentes à soma de grupos fenólicos de tirosina e grupos ϵ -amino de lisina, principalmente.

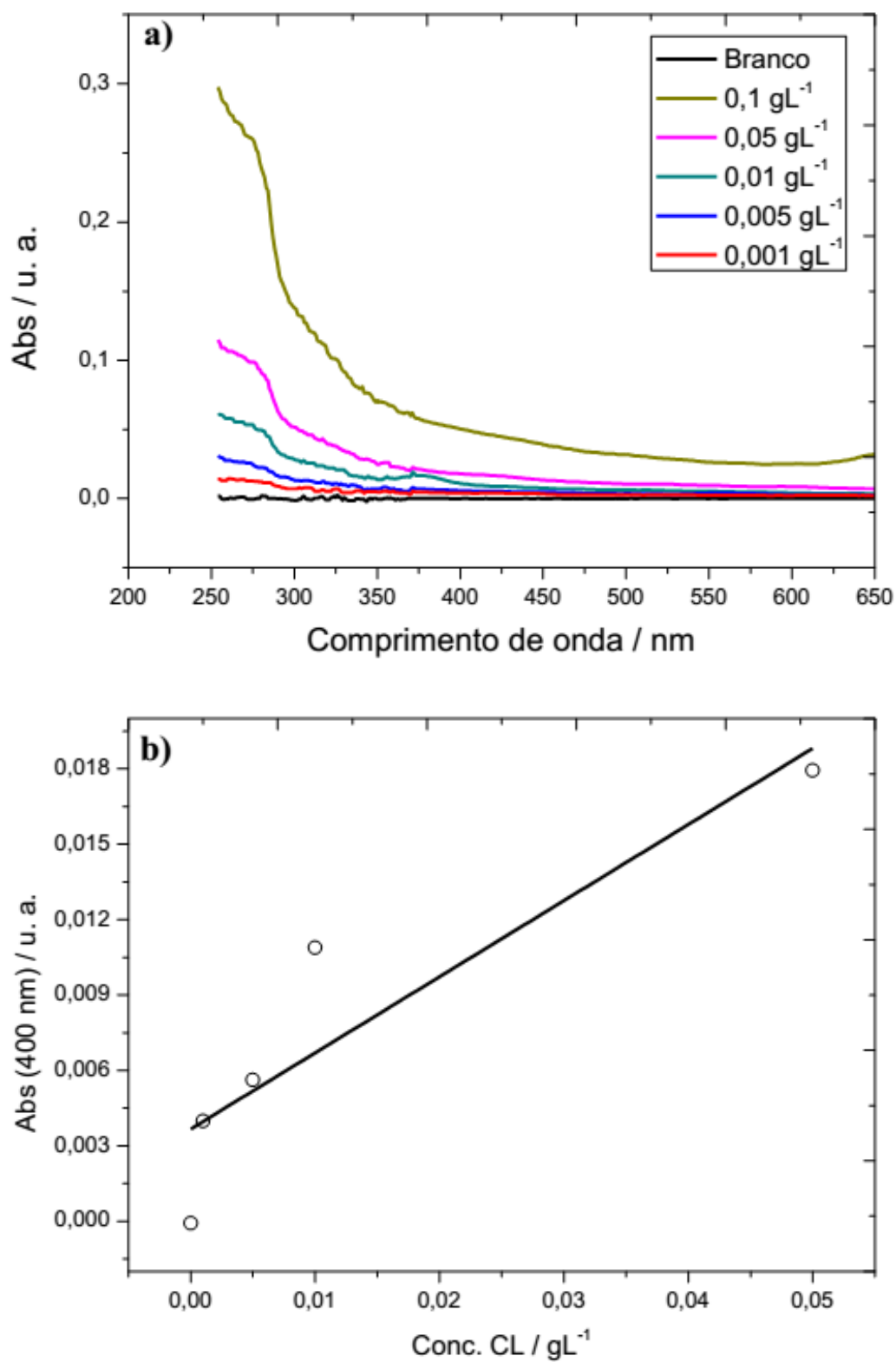
Tabela IV.3 – Resultado dos dados experimentais da titulação potenciométrica do CL considerando a presença de cinco grupos funcionais tituláveis.

Grupo funcional ionizável	pKa	Sítios / mmol/g
β -carboxílico e γ -carboxílico	$2,992 \pm 0,004$	$0,612 \pm 0,008$
	$4,389 \pm 0,007$	$0,513 \pm 0,003$
Imidazol	$6,279 \pm 0,052$	$0,086 \pm 0,001$
ϵ -amino e fenóis	$7,797 \pm 0,032$	$0,142 \pm 0,0003$
	$9,649 \pm 0,022$	$0,537 \pm 0,013$

Fonte: MESQUITA *et al.*, 2011. Adaptado.

De modo semelhante aos *CDs* e a *QT*, utilizando-se a espectroscopia na região UV-Vis, o valor de absorvidade molar (ϵ) foi determinado em 400 nm (Figura IV.10b), para ser utilizado na quantificação dos materiais que compõem os filmes automontados (MESQUITA *et al.*, 2011). O valor obtido para o CL foi de $0,045 \text{ m}^2/\text{g}$.

Figura IV.10 – (a) Espectro UV-Vis da solução de CL em ácido acético 1 % (v/v); (b) Absorbância em 400 nm em função da concentração da solução de CL.



IV.4. Conclusões parciais

Foram preparados *CDs* utilizando-se o método de desidratação ácida. Estas nanoestruturas apresentaram solubilidade em água, tamanhos de aproximadamente $2,7 \pm 0,5$ nm e uma estrutura altamente oxidada, com um total de grupos funcionais ácidos de 4,5 mmol/g, sendo que aproximadamente 63 % dos grupos funcionais tem pKa característico de grupos carboxílicos. Através da espectroscopia UV-Vis foi possível calcular a absorptividade molar dos *CDs*, em 400 nm, onde obtivemos o valor de $0,23 \text{ m}^2/\text{g}$.

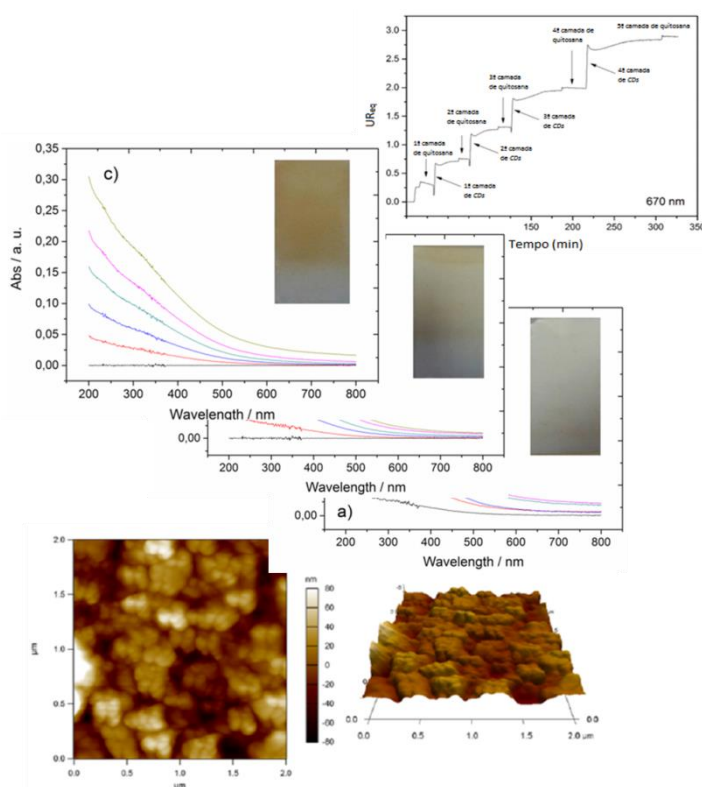
Em adição, o biopolímero QT utilizado neste trabalho apresentou um total de grupos funcionais ácidos de 4,3 mmol/g com pKa estimado em 6,2. Por meio das técnicas de IVTF e titulação potenciométrica, obtivemos o grau de desacetilação da QT, sendo 75 e 69 %, respectivamente. Com estas mesmas técnicas, determinou-se a densidade de cargas na superfície do CL e os grupos funcionais ionizáveis com seus respectivos valores de pKa. Por outro lado, com os espectros obtidos com a espectroscopia UV-Vis obtivemos a absorptividade molar dos dois biopolímeros, QT e CL, em 400 nm, obtendo-se os valores de $2,2 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,045 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente.

Após estas caracterizações, os filmes automontados de QT/*CDs* e CL/*CDs* foram preparados.

Capítulo V

Caracterização dos filmes QT/CDs

O controle das propriedades, isto é, morfologia, espessura e estrutura de filmes finos é essencial no desenvolvimento de diferentes dispositivos como sensores e dispositivos conversores de energia. Neste capítulo são mostrados todos os resultados obtidos com a



caracterização dos filmes automontados preparados a partir das deposições alternadas de QT e CDs. Primeiramente serão apresentados os resultados de Ressonância de Plasma de Superfície. Em especial, é mostrada a efetiva formação do filme, monitorando com esta técnica, a deposição alternada de biopolímero e CDs. Em adição, o efeito do pH e força iônica na espessura da monocamada de QT. Em seguida, são mostrados os resultados obtidos com a espectroscopia na região

UV-Vis do espectro eletromagnético. A partir dos dados obtidos foi possível avaliar o efeito das condições da solução, diferentes pH e força iônica, na quantidade de material depositado sobre o substrato. A partir destes resultados e da discussão sobre o efeito do pH e da força iônica do meio na conformação estrutural das cadeias poliméricas, foi sugerido que a espessura dos filmes pode ser controlada por meio das variações das condições de pH e força iônica das soluções. Esta hipótese foi confirmada por meio do uso da Microscopia de força atômica. Esta técnica foi também utilizada para a caracterização da topologia dos filmes obtidos. Enfim, neste capítulo é mostrado que filmes automontados com propriedades bem definidas podem ser preparados por meio do controle das propriedades das soluções em adição ao número de ciclos de imersão, deposição.

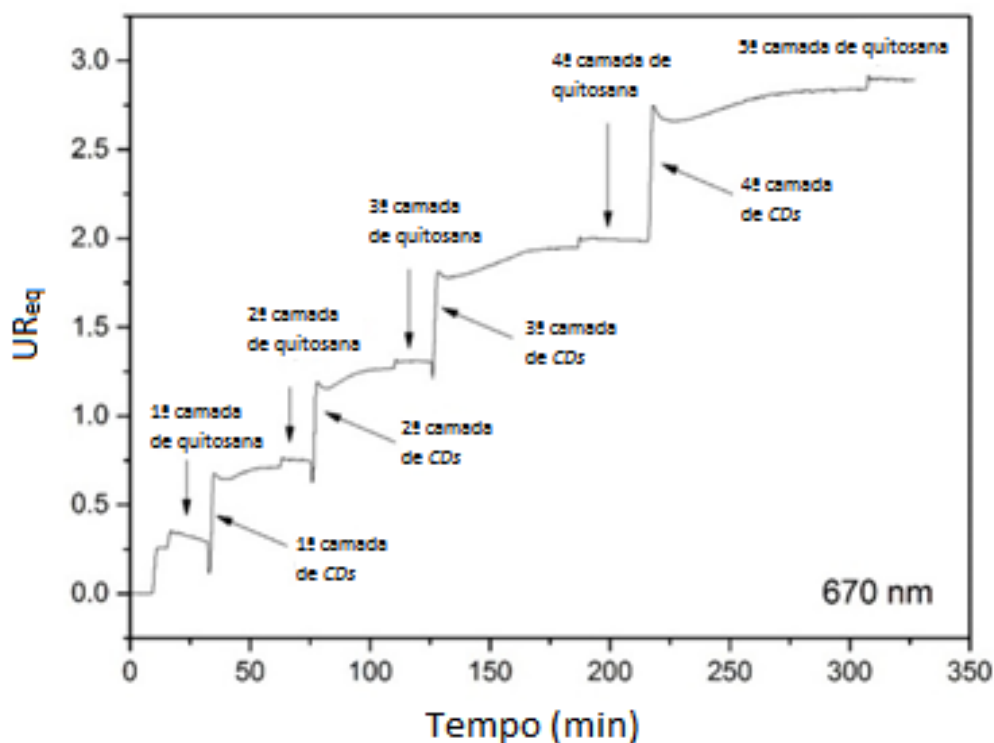
As propriedades e consequentemente o desempenho de filmes finos é altamente dependente da morfologia da superfície, espessura e interação entre os seus componentes.

V.1. Adsorção das camadas e massa depositada dos filmes QT/CDs

A técnica de RPS é baseada nas propriedades ópticas dos componentes analisados, podendo ser empregada para estudos de fenômenos de superfície. Neste trabalho, a RPS foi utilizada para avaliar a capacidade de adsorção alternada das camadas de QT e CDs. Dessa forma, os resultados podem ou não sugerir se a interação entre os componentes estudados é forte o suficiente para que filmes estáveis possam ser obtidos com estes materiais. Em adição, a técnica foi também utilizada para determinação da espessura da camada de QT em diferentes condições de pH e força iônica.

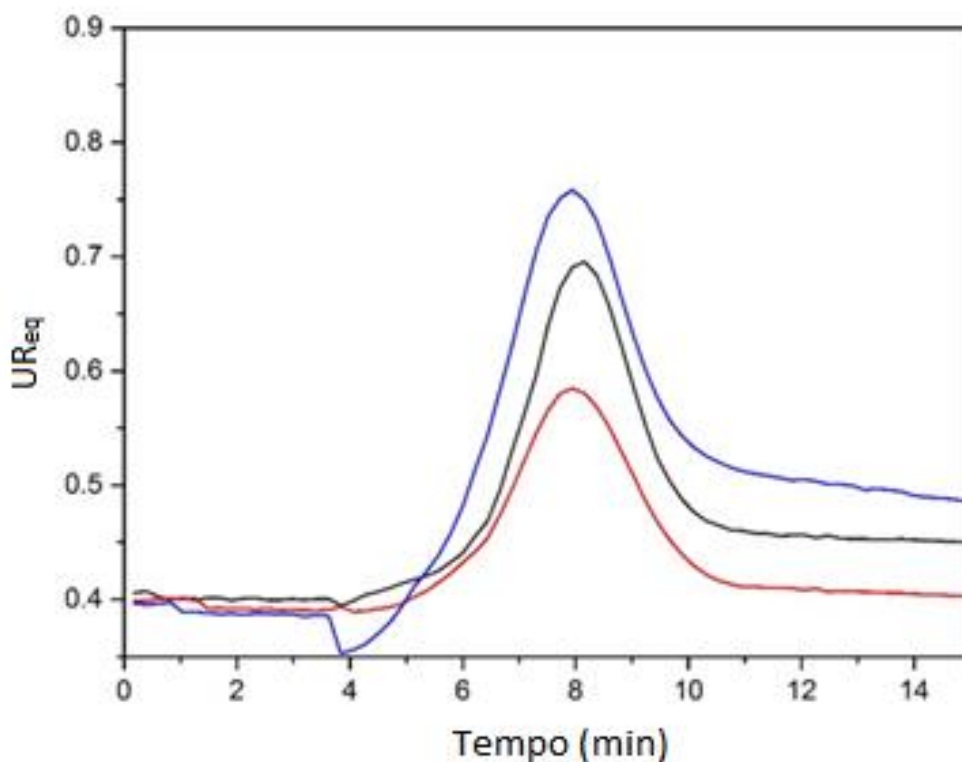
Na Figura V.1 o sensograma obtido sobre um sensor RPS Au-SiO₂ é mostrado, sendo que a variação do ângulo de RPS é representada como unidades de ressonância (UR). Tipicamente, 1000 UR correspondem a uma variação de ângulo de aproximadamente 0,1°. Após a estabilização da resposta do sinal com a passagem do solvente pelo sensor, o que ocorre em aproximadamente 18 minutos, a solução de QT foi injetada (1ª camada de QT, Figura V.1). Como esperado, ocorre um aumento imediato na UR que posteriormente tende a diminuir e estabilizar. Logo em seguida, é injetada a solução contendo CDs. A injeção das nanoestruturas de carbono gera um súbito aumento na UR, sugerindo uma grande quantidade de material depositado sobre a primeira camada de QT. Este ciclo foi repetido mais 3 vezes e os resultados obtidos mostram claramente a deposição alternada das camadas de QT e CDs, evidenciada pelo aumento da UR. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que as camadas de QT e CDs têm afinidade mútua e que suas interações são fortes o suficiente para manter o sistema estável ao longo do tempo de realização do experimento.

Figura V.1 – Sensograma de adição de camadas alternadas de QT e CDs em solução aquosa de ácido acético 3 % v/v, sobre um sensor de Au-SiO₂. As medidas foram realizadas com um laser de 670 nm.



Em um segundo conjunto de experimentos, o efeito das condições de pH e força iônica da solução de QT nos ângulos de RPS foram avaliados. Os resultados estão apresentados na Figura V.2. Durante a injeção da solução de QT, iniciada em 4 minutos, ocorre uma intensa variação nos ângulos de RPS em todas as condições avaliadas, como consequência da grande quantidade de material inicialmente depositado sobre a superfície do sensor. Posteriormente, a variação do ângulo diminui devido à remoção do excesso de material sobre o sensor e a estabilização ocorre a partir de aproximadamente 12 minutos. Pode ser verificado que, as maiores variações de UR ocorrem em pH = 5 e pH = 3,5 na presença de NaCl 0,1 mol/L. Este resultado sugere que nestas condições ocorre uma maior deposição de material sobre o sensor. A partir do uso do *software* Winspall® (Res-Tec-Ressonante Technologies® GmbH) por meio de simulações de curvas de RPS, com base na espessura do sensor, nas camadas adsorvidas e nos índices de refração, a estimativa da espessura da monocamada de QT, usando os valores de UR em 4 e 12 minutos, foram obtidas. A espessura da camada calculada, utilizando-se uma solução de ácido acético 3 % v/v em pH = 3,5, foi de 0,72 nm. Em pH = 5, a espessura estimada aumentou para 1,2 nm, enquanto em uma força iônica mais elevada, ácido acético 3 % v/v com NaCl 0,1 mol/L, a camada de QT ficou ainda mais espessa, chegando a um valor de 1,4 nm.

Figura V.2 – Sensograma de adição de camadas de QT sobre as de CDs em solução aquosa de ácido acético 3 % v/v (linha vermelha), em pH 5 (linha preta) e ácido acético 3 % v/v em NaCl 0,1 mol/L (linha azul).



Sabe-se que as características dos filmes automontados, morfologia e espessura, dependem da interação entre os dois componentes e esta interação depende da morfologia e da superfície química dos dois materiais. Se, por um lado, a morfologia das nanopartículas é invariável, a conformação da cadeia do polímero ou aglomerados é altamente complexa e depende das condições de pH e da força iônica do meio (VARGAS *et al.*, 2012; SORLIER; VITON; DOMARD, 2002; RINAUDO, 2006). Deste modo, foi realizado um breve estudo do efeito de diferentes condições de pH e força iônica sobre a carga superficial e viscosidade da solução de QT. Na Tabela V.1 são mostrados os valores de potenciais ζ das soluções poliméricas com diferentes condições de pH e força iônica. Em pH = 3,5, os grupos amino estão totalmente protonados ($-\text{NH}_3^+$) gerando um potencial ζ de +39 mV. Como resultado, há uma grande repulsão intra e intermolecular das cadeias poliméricas gerando conformações mais rígidas e estendidas. Por outro lado, em pH = 5, o baixo grau de protonação gera um menor potencial ζ , de +9,2 mV, permitindo que as interações intra e intermoleculares sejam mais intensas, resultando em estruturas poliméricas com conformações mais flexíveis (CHEN *et al.*, 2011).

Figura V.3 – Viscosidade das soluções de QT em pH = 3,5, pH = 5,0 e pH = 3,5 + NaCl (0,1 mol/L).

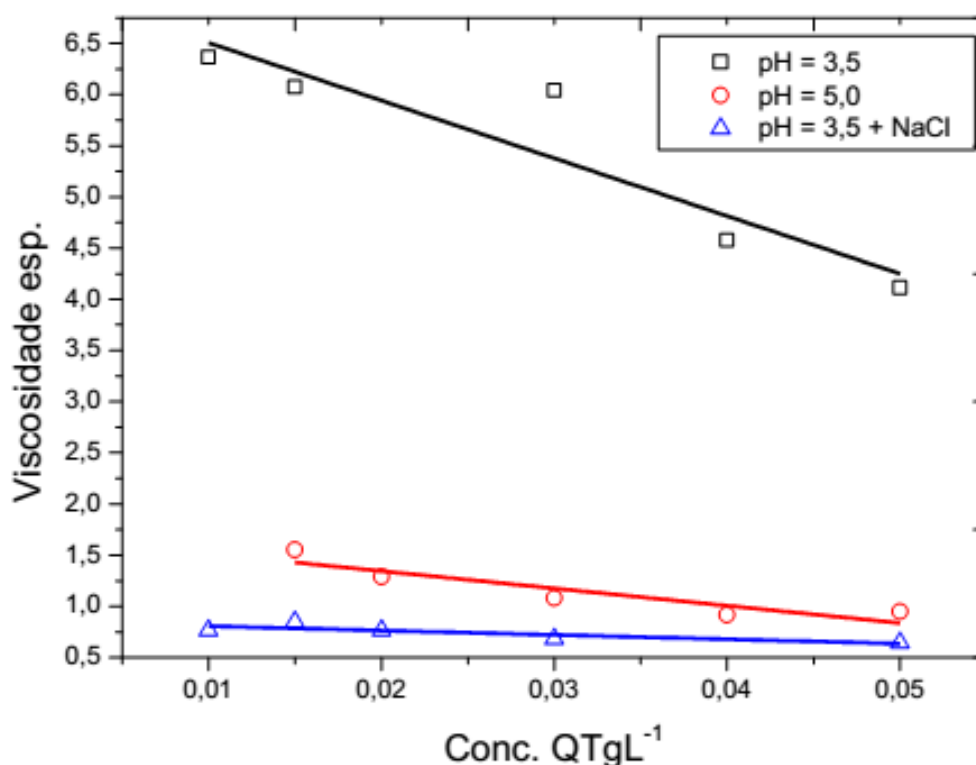


Tabela V.1 – Viscosidade intrínseca e potencial ζ das soluções de QT em diferentes condições, 25 °C.

Condições das soluções	Viscosidade intrínseca / Lg ⁻¹	Potencial ζ / mV
Ácido acético 3 % (v/v, pH = 3.5)	7,1 ± 0,5	+39 ± 5,9
Ácido acético 3 % (v/v, pH = 5.0)	1,7 ± 0,2	+9,2 ± 1,1
Ácido acético 3 % (v/v, pH =3.5) e NaCl (0,1 mol/L)	0,8 ± 0,1	+19 ± 2,5

Com o aumento da força iônica da solução, em pH = 3,5 na presença de NaCl 0,1 mol/L, o potencial ζ diminui, devido aos efeitos de blindagem eletrostática. De modo semelhante ao aumento do pH, esta condição resulta em um aumento nas interações entre as cadeias do polímero, intra e intermoleculares, gerando assim uma conformação estrutural mais flexível (VARGAS *et al.*, 2012).

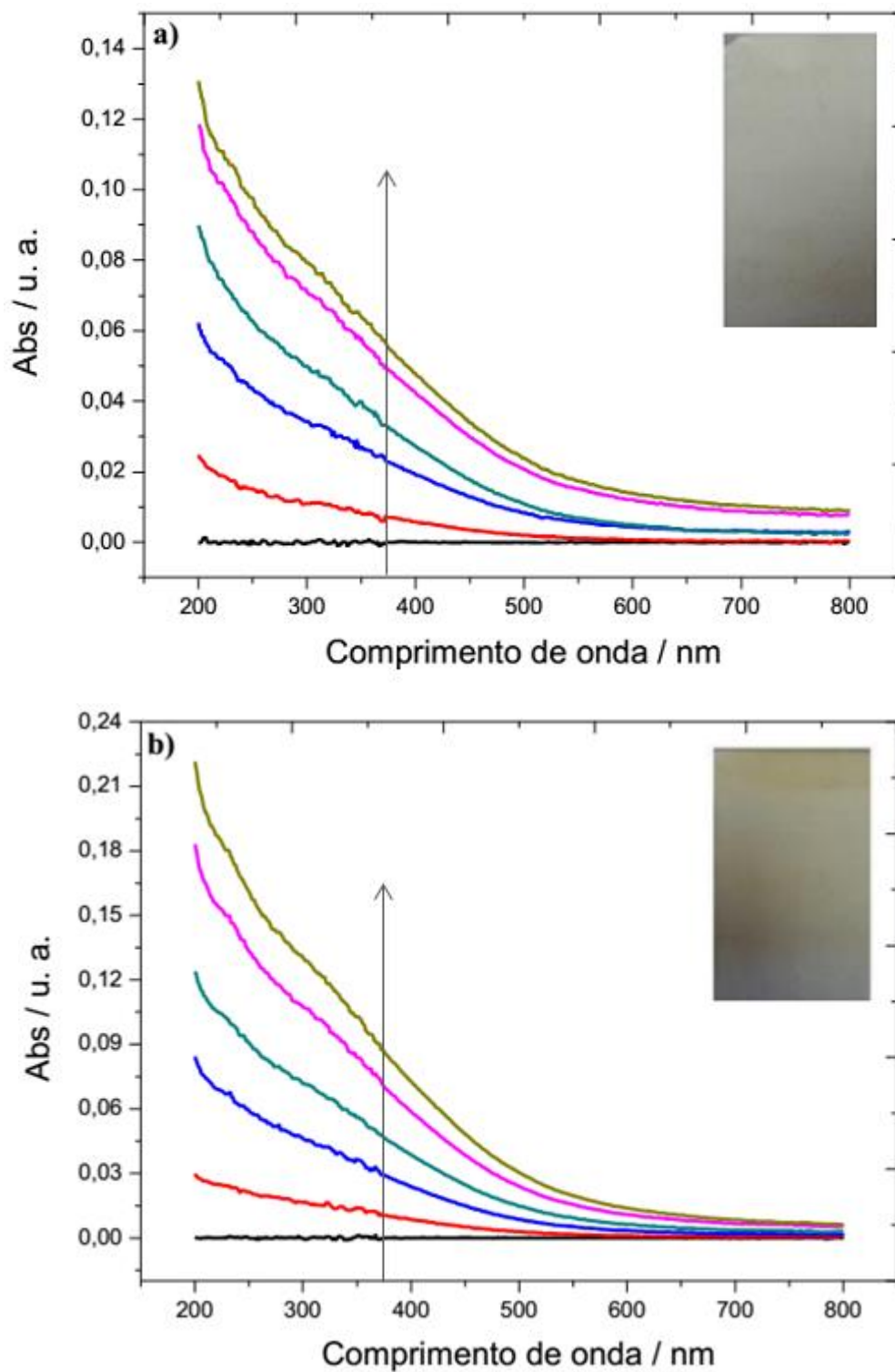
Na Figura V.3 são mostrados os valores de viscosidades específicas obtidas para as diferentes condições das soluções de QT. À diluição infinita, ou seja, com a extrapolação dos resultados de viscosidade específica para a concentração de QT igual a zero, obtém-se os valores de viscosidade intrínseca, mostrados na Tabela V.1. Tipicamente, as interações

polímero-solvente são fortes quando a conformação da cadeia do polímero está estendida (KASAAI, 2007). Sob estas condições, espera-se uma maior interação entre as cadeias do polímero com as moléculas do solvente, elevando a viscosidade da solução conforme os resultados apresentados na Tabela V.1.

Enfim, em pH e força iônica elevadas, as cadeias de polímeros são menos carregadas e nestas condições são permitidas conformações mais flexíveis e maiores interações intra e intermoleculares, e, conseqüentemente, a formação de estruturas maiores as quais podem gerar camadas mais espessas, como demonstrado pela técnica de RPS. Em adição, estas camadas mais espessas apresentam maior quantidade de material depositado. Dessa forma, o crescimento dos filmes automontados foi também monitorado por espectroscopia UV-Vis.

Os espectros de absorbância UV-Vis foram obtidos após a deposição de duas bicamadas (1 bicamada = 1 camada de QT + 1 camada de *CDs*), que ocorrem em ambos os lados do substrato de quartzo. A Figura V.4 mostra os espectros de absorção UV-Vis obtidos com o aumento de bicamadas depositadas. Para todas as condições experimentais, houve um aumento da absorção com o número de bicamadas depositadas. Além disso, verificou-se que o aumento do pH (Figura V.4b) e da força iônica (Figura V.4c) formam filmes mais amarelados, sugerindo um aumento na quantidade do material depositado. A fim de verificar que o aumento do pH e da força iônica levam para a formação de filmes com uma maior quantidade de material depositado, o valor da absorção em 400 nm foi representado graficamente em função do número de bicamadas (Figura V.5). Este comprimento de onda foi escolhido com base nas características de absorção dos dois materiais. Em 400 nm, os valores de absorvidade molar encontrados para a QT e os *CDs* são, respectivamente, $2,2 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,23 \text{ m}^2/\text{g}$. Portanto, em 400 nm, a absorbância observada é atribuída, principalmente, aos *CDs*, pois a absorvidade molar da QT, nesta região, é aproximadamente 100 vezes menor.

Figura V.4 – Espectros UV-Vis dos filmes preparados com soluções de QT em diferentes condições: (a) pH = 3,5; (b) pH = 5,0; c) pH = 3,5 e NaCl 0,1 mol/L. Em (c) as soluções de QT e de CDs foram ajustadas para NaCl 0,1 mol/L. Os espectros correspondem às 0, 4, 8, 12, 16 e 20 bicamadas. Inserções: Fotografias dos filmes preparados em substrato de vidro. A seta indica o crescimento a cada bicamada.



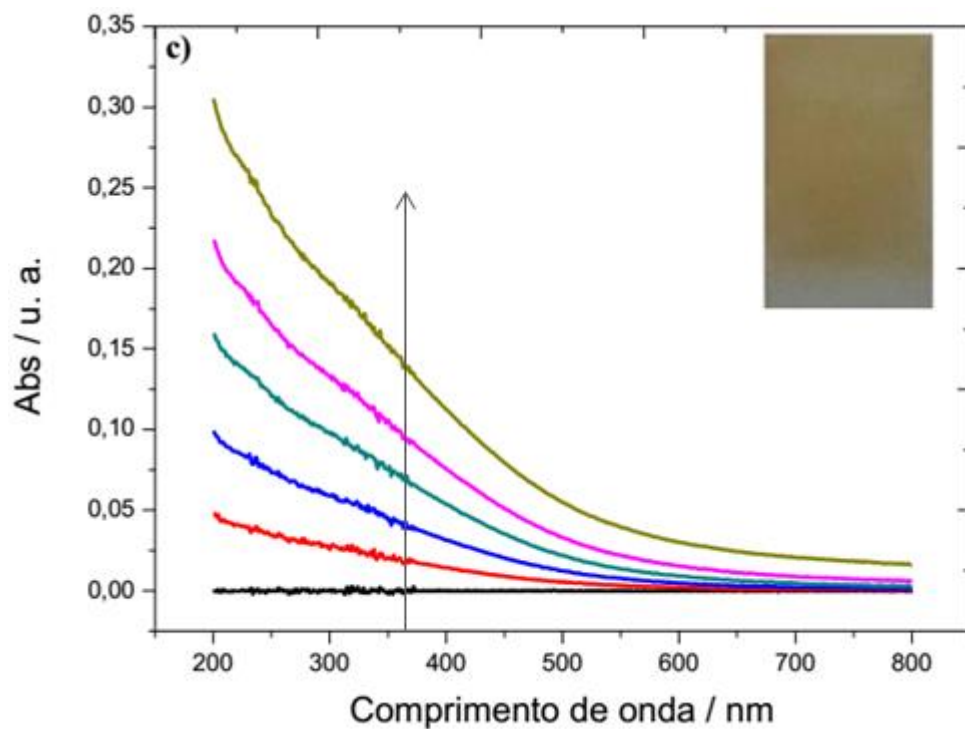
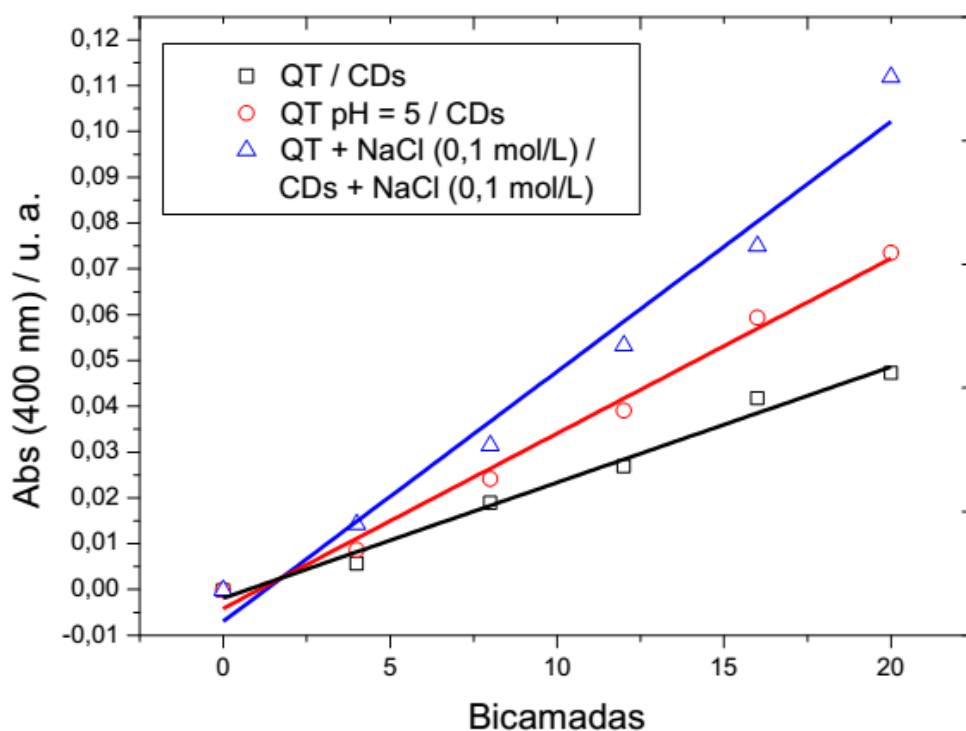


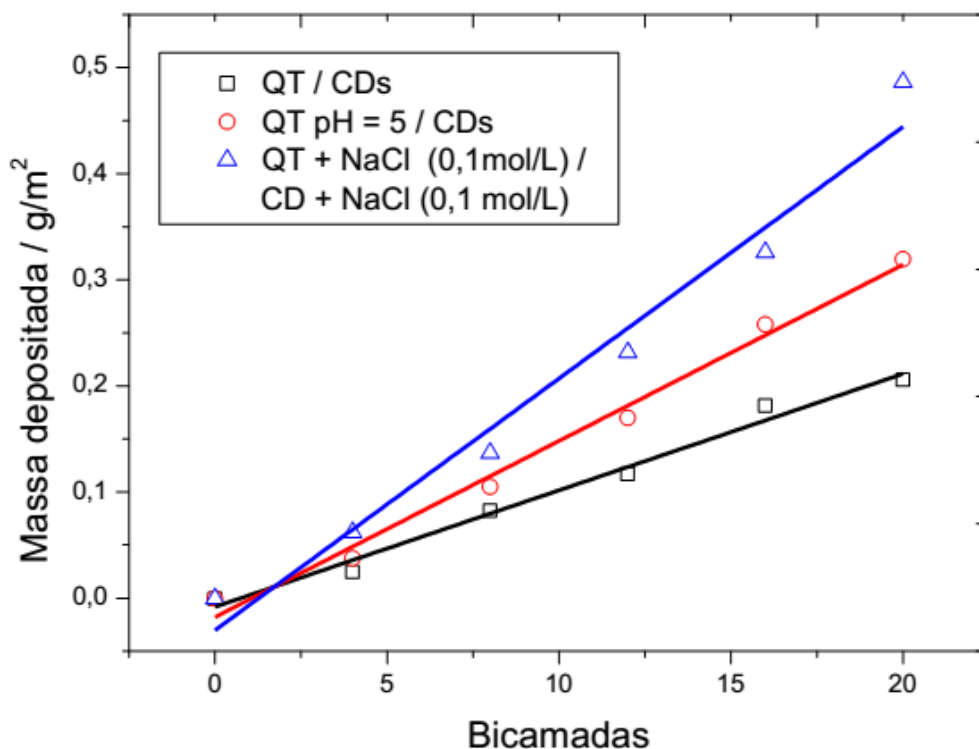
Figura V.5 – Absorbância em 400 nm em função do número de bicamadas de QT/CDs.



Como mostrado na Figura V.5, todos os filmes de multicamadas apresentaram um aumento linear de absorção em 400 nm com o número de bicamadas depositadas. Estes resultados sugerem a adsorção da mesma quantidade de material em cada ciclo de deposição

de QT e *CDs*. Além disso, este resultado indica uma formação homogênea do filme e a considerável ausência de aglomerados dos materiais em cada camada do nanocompósito preparado (SHIM *et al.*, 2007). A partir dos resultados de absorvância apresentados na Figura V.5 e do valor da absorvância molar em 400 nm, a quantidade de massa de *CDs* depositados foram calculados e os resultados estão mostrados na Figura V.6. Detalhes da manipulação de unidades e do cálculo realizado podem ser verificados no material em anexo.

Figura V.6 – Quantidade de *CDs* depositada em cada ciclo.



A partir da inclinação do gráfico, determinou-se a quantidade de 11 mg/m², 16 mg/m² e 24 mg/m² de *CDs* depositados em cada ciclo de adsorção para as amostras preparadas com soluções de QT em pH = 3,5, pH = 5 e pH = 3,5 na presença de NaCl, respectivamente. O aumento da massa depositada de *CDs* com o aumento do pH e da força iônica pode ser associado a uma maior quantidade de QT depositada e/ou ao aumento da massa depositada das nanopartículas (Figura V.4). Vários estudos têm mostrado que a conformação da cadeia do polímero QT depende de vários parâmetros, como, grau de acetilação, comprimento da cadeia, força iônica, solvente, temperatura, pH e constante dielétrica do solvente (SORLIER; VITON; DOMARD, 2002; SORLIER *et al.*, 2001; SORLIER *et al.*, 2003). Resultados similares foram observados em outros estudos na preparação de filmes automontados de QT e heparina (LUNDIN *et al.*, 2011; BODDOHI;

KILLINGSWORTH; KIPPER, 2008). De acordo com estes autores, o aumento da quantidade de material depositado e a espessura estão relacionadas com a conformação da cadeia polimérica da QT em diferentes condições de pH e de força iônica. A heparina é um poliânion forte, que adsorve em uma conformação estendida, conduzindo a camadas mais finas. Em contraste, por ser um polycation fraco, a QT está mais susceptível a ser afetada por alterações no pH e força iônica. Boddohi e colaboradores, prepararam filmes através da técnica *LbL* com heparina (um poliânion forte) e QT (um polycation fraco) e verificaram que em tampão 0,2 mol/L, a espessura dos filmes pode variar, de menos de 2 nm por bicamada para até 4 nm por bicamada, variando-se o pH da solução (BODDOHI; KILLINGSWORTH; KIPPER, 2008). Por sua vez, Almodóvar e colaboradores, verificaram que a hidrofília e o aumento da espessura é reduzido quando um polieletrólito é forte (por exemplo, N, N, N-trimetil quitosana) e o outro é fraco (por exemplo, ácido hialurônico) (ALMODÓVAR *et al.*, 2011). No presente estudo, os *CDs* e a QT têm apenas grupos fracamente ácidos. Deste modo, suas cargas na superfície são altamente afetadas pelas condições de pH e de força iônica da solução. No entanto, diferentemente das cadeias de QT, a estrutura das nanopartículas de carbono ("conformação") é invariável.

Para avaliar o efeito da carga na superfície dos *CDs* sobre a quantidade de material depositado, filmes *LbL* foram preparados sob diferentes condições de força iônica da solução de *CDs*. Os espectros UV-Vis obtidos para os filmes são apresentados na Figura V.7. As absorbâncias em 400 nm e as massas depositadas obtidas para cada filme são mostradas na Figura V.8.

Figura V.7 – Espectros UV-Vis dos filmes preparados em diferentes condições: (a) QT pH = 3,5 e solução de CDs; (b) QT pH = 3,5 e solução de CDs (NaCl 0,1 mol/L). Solução de CDs pH = 6. Os espectros apresentados correspondem às 0, 4, 8, 12, 16 e 20 bicamadas. A seta indica o crescimento a cada bicamada.

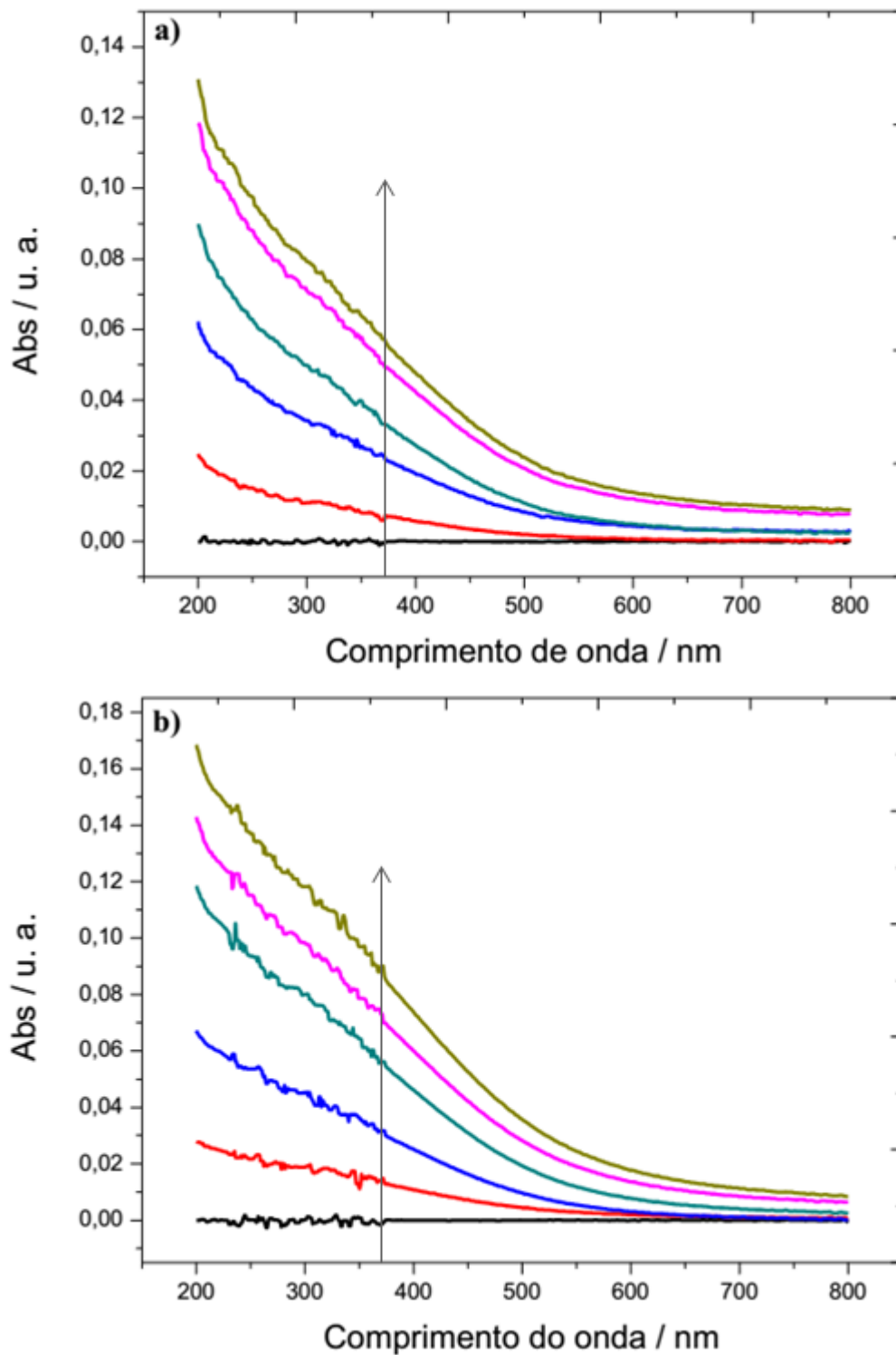
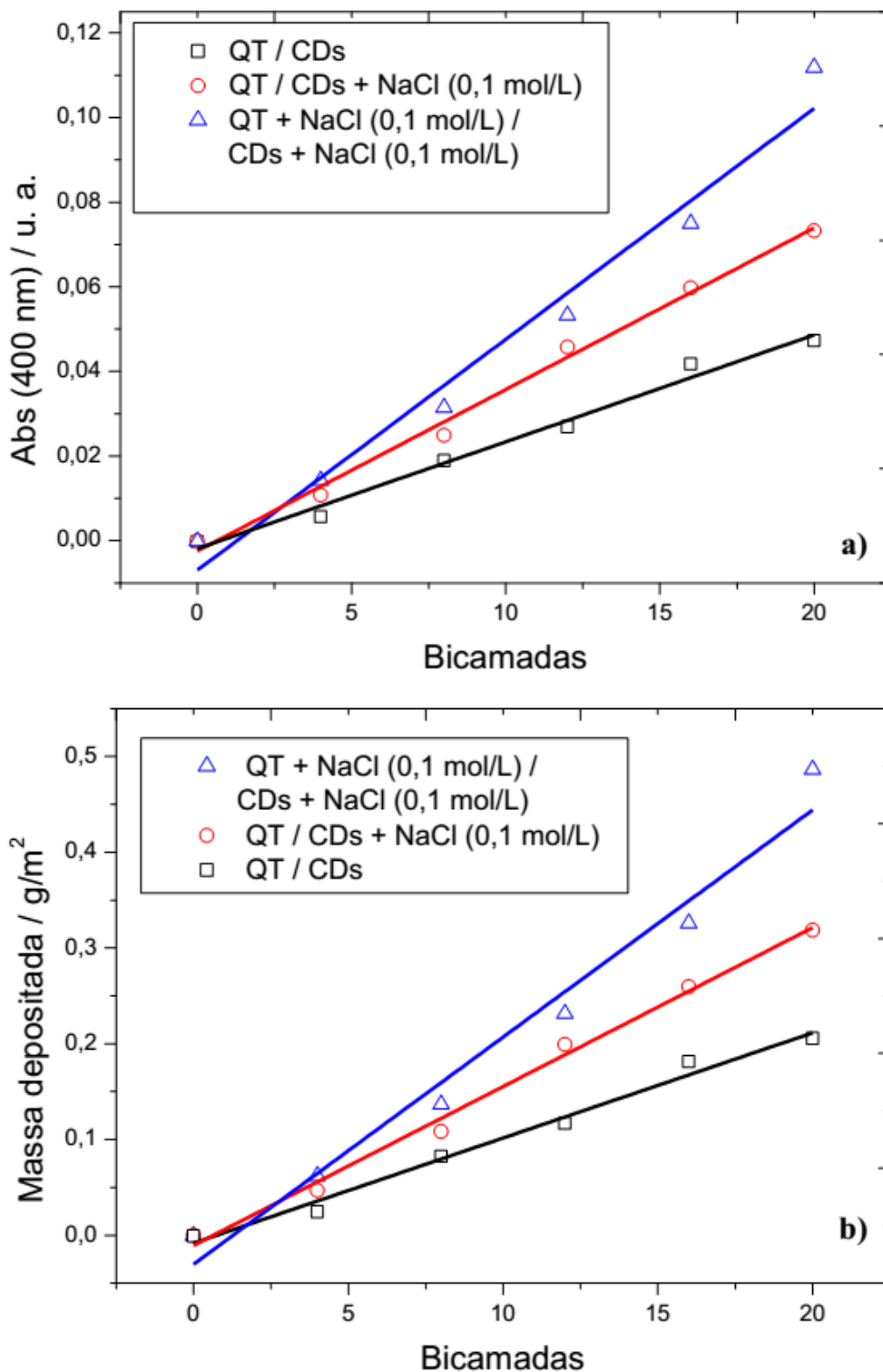


Figura V.8 – (a) Absorbância em 400 nm em função do número de bicamadas de QT/CDs; (b) Efeito da força iônica das soluções de QT e de CDs na quantidade de massa de CDs depositada.



As quantidades de material depositado foram de 11 mg/m², 16 mg/m² e 24 mg/m² para os filmes preparados com soluções aquosas de força iônica diferentes. Pode ser observado que o aumento da força iônica da solução de CDs gera um aumento na quantidade

de material depositado (símbolos preto e vermelho na Figura V.8b). Este resultado comprova que a força iônica da solução de *CDs* influencia na quantidade de nanopartículas depositadas em cada camada, uma vez que sua superfície é predominantemente composta por ácidos oxigenados fracos, por exemplo, fenólicos e carboxílicos. A presença de íons em solução influencia fortemente na estabilidade de suspensões de nanoestruturas de carbono (LIN *et al.*, 2009). O aumento da força iônica na suspensão de *CDs* pode estabilizar a carga de superfície das nanopartículas, reduzindo o potencial ζ (Tabela V.2), permitindo uma maior interação entre os mesmos e, conseqüentemente, uma maior agregação. No entanto, nas condições utilizadas, a repulsão eletrostática é ainda mais elevada do que a atração fornecida pela força de van der Waals, eliminando totalmente a barreira de energia para a precipitação. Como resultado, ocorre a adsorção de aglomerados de *CDs*. Por outro lado, a quantidade de material depositado é ainda maior quando a força iônica de ambas as soluções é elevada (Figura V.8b). Assim, o aumento do material depositado está relacionado também com o aumento da flexibilidade da cadeia do polímero em pH e força iônica mais elevados. Devido à maior flexibilidade do polímero nestas condições, as cadeias poliméricas adotam uma conformação mais apropriada para a adsorção, sobre a morfologia da superfície quase esférica dos *CDs*, gerando filmes mais compactos e espessos, apesar de, nestas condições, haver uma diminuição da interação eletrostática, devido às cargas da superfície estarem reduzidas no polímero (Tabela V.1).

Tabela V.2 – Potencial ζ obtido para os *CDs* em diferentes condições em solução aquosa.

	<i>CDs</i>
Potencial ζ / mV	$-47 \pm 17^*$
	$-8,9 \pm 1,2^{**}$

* pH = 5,4; ** pH = 5,4 e força iônica de 0,1 mol/L.

O aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas, que resulta em uma maior deposição de nanoestruturas, desempenha um papel importante nas propriedades mecânicas de nanocompósitos obtidos pela técnica de deposição camada por camada (PODSIADLO *et al.*, 2007).

V.2. Morfologia e espessura dos filmes QT/CDs

Como mostrado pelas técnicas de RPS e espectroscopia UV-Vis, as condições das soluções afetam significativamente as espessuras ou quantidades de QT e CDs depositados nas camadas dos filmes preparados. Aqui, a Microscopia de Força Atômica (MFA) foi utilizada para examinar não somente a estrutura da superfície, mas também a espessura dos filmes automontados de QT/CDs obtidos.

Como mostrado na Figura V.10, em geral, todos os filmes preparados em lâminas de vidro, resultaram em estruturas similares a uma cadeia de montanhas e vales. No entanto, as topografias observadas nas amostras são consideravelmente diferentes.

No filme preparado em pH baixo e força iônica baixa (Figura V.11), é possível observar partículas muito pequenas que formam uma topografia muito rugosa, mas com baixas amplitudes. A rugosidade média (RMS) de 11 nm foi obtida para um filme de espessura de aproximadamente 60 nm (para 20 bicamadas). Uma vez que a quantidade de material depositado nestas condições é muito pequena, este resultado sugere que os CDs são adsorvidos isoladamente ou com baixo grau de aglomeração. Além disso, o revestimento de nanopartículas de carbono é muito fino a ponto de serem observadas partículas esféricas muito pequenas.

Com o aumento do pH para 5 (Figura V.12), a morfologia do filme apresenta-se com aglomerados esféricos maiores do que os apresentados na Figura V.11. Esta observação sugere uma adsorção de aglomerados de CDs e um revestimento mais eficaz sobre os mesmos, formado pelo polímero QT, devido à maior flexibilidade da cadeia polimérica. Por sua vez, as cadeias flexíveis do polímero, nestas condições, podem interagir fortemente com aglomerados maiores de CDs, contribuindo para a formação de filmes mais espessos. A espessura média do filme foi de aproximadamente 150 nm (para 20 bicamadas), com uma RMS = 28 nm.

O filme preparado com força iônica elevada, QT e suspensão de CDs na presença de NaCl 0,1 mol/L, (Figura V.13) mostra uma topografia lisa, com desaparecimento quase total de partículas esféricas, o que sugere que nestas condições, as cadeias do polímero, mais flexíveis, adotam conformações apropriadas para maximizar as interações com os aglomerados de CDs e, conseqüentemente, uma quantidade maior de material é depositada durante o crescimento do filme. A espessura do filme preparado sob estas condições foi de aproximadamente 200 nm (para 20 bicamadas) com uma RMS = 37 nm.

Figura V.10 – Representação do efeito do pH e força iônica das soluções de QT e CDs nas propriedades dos filmes.

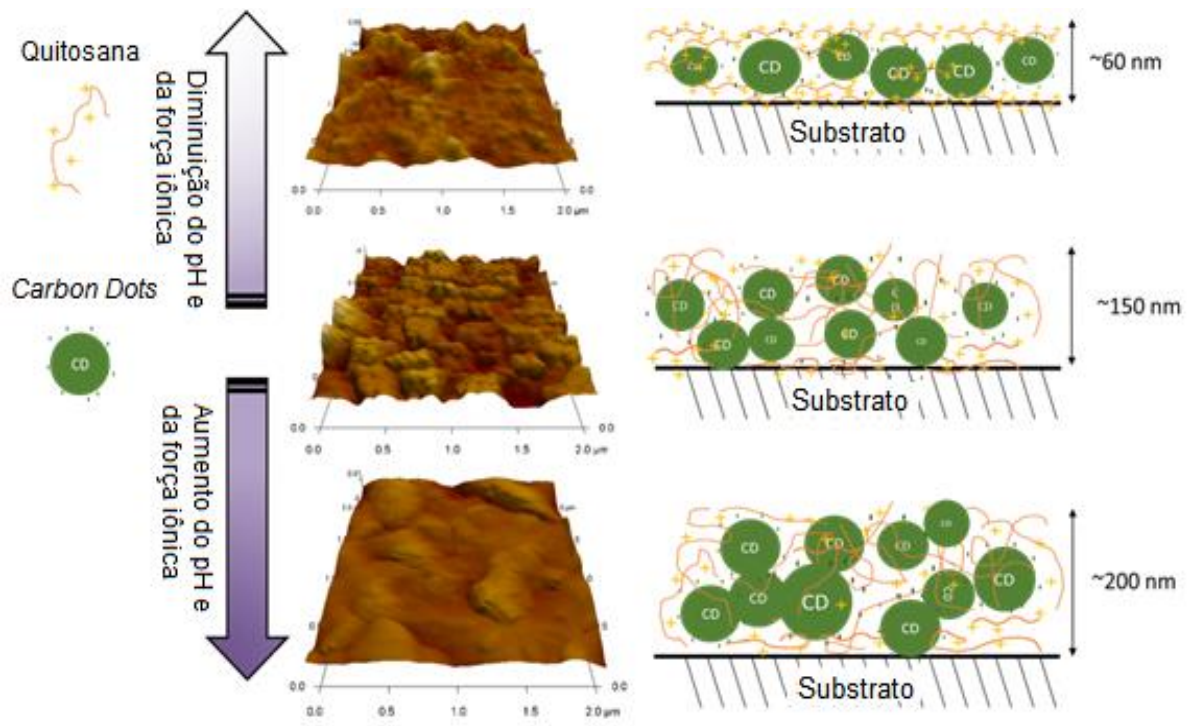


Figura V.11 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de QT/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de QT em pH = 3,5 (a) altura de uma área de 2 μm x 2 μm , (b) perfil de espessura dos filmes *LbL* ao longo da linha na imagem.

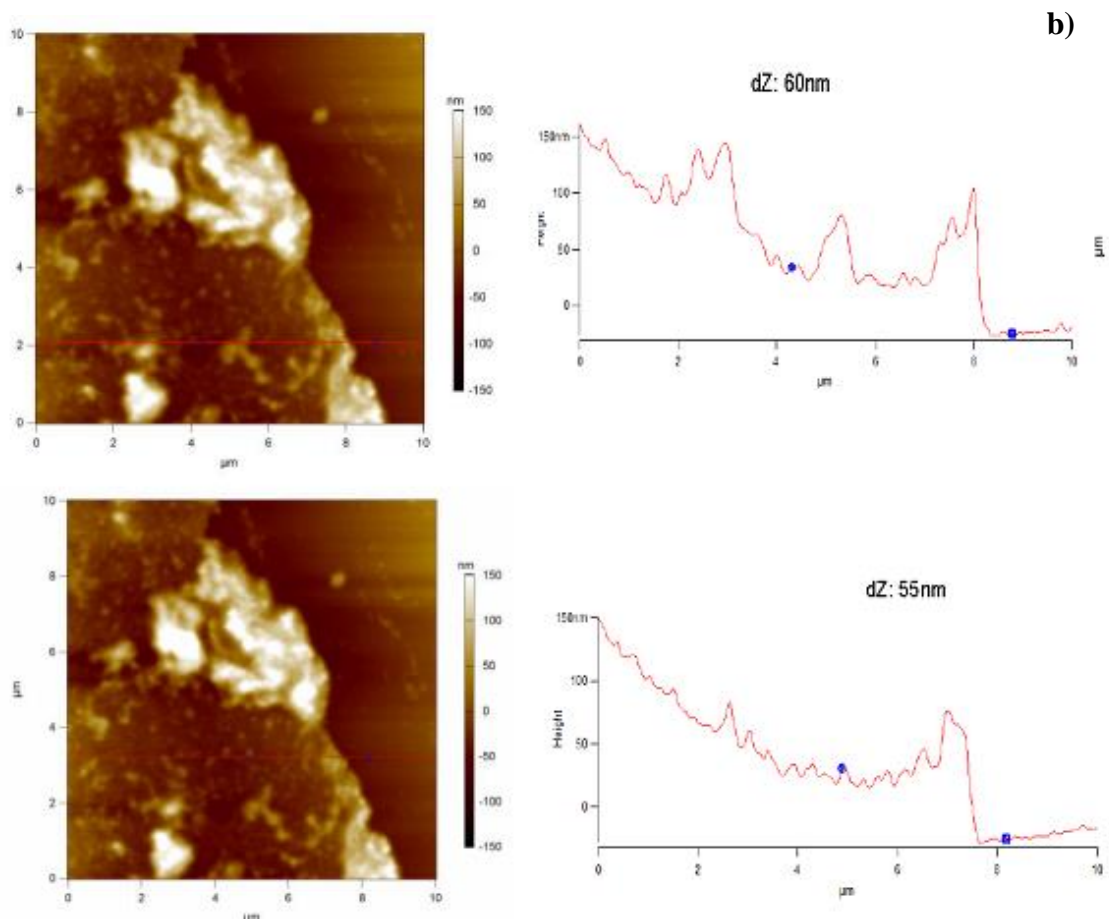
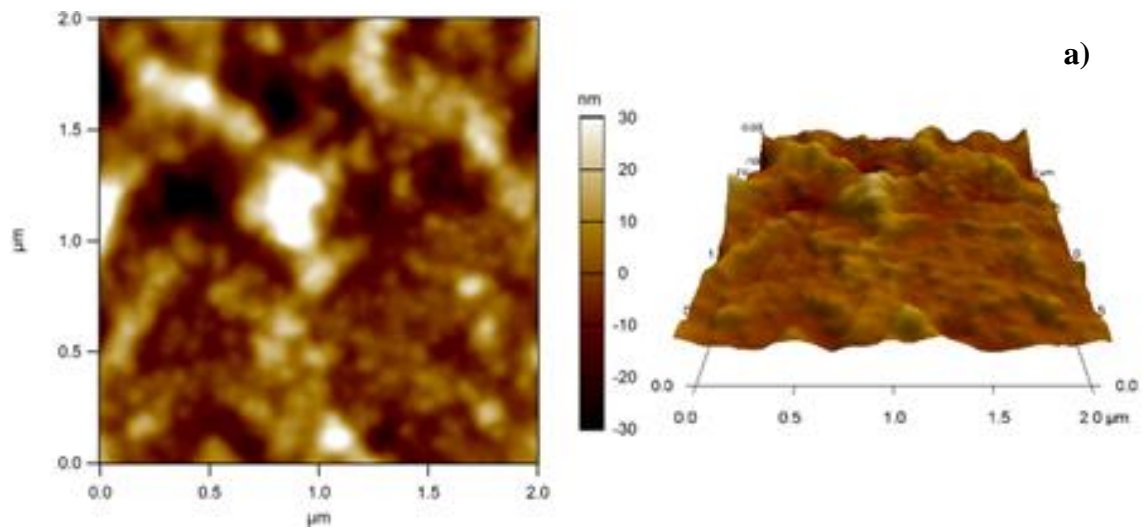


Figura V.12 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de QT/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de QT em $\text{pH} = 5$ (a) altura de uma área de $2\text{ }\mu\text{m} \times 2\text{ }\mu\text{m}$, (b) perfil de espessura dos filmes *LbL* ao longo da linha na imagem.

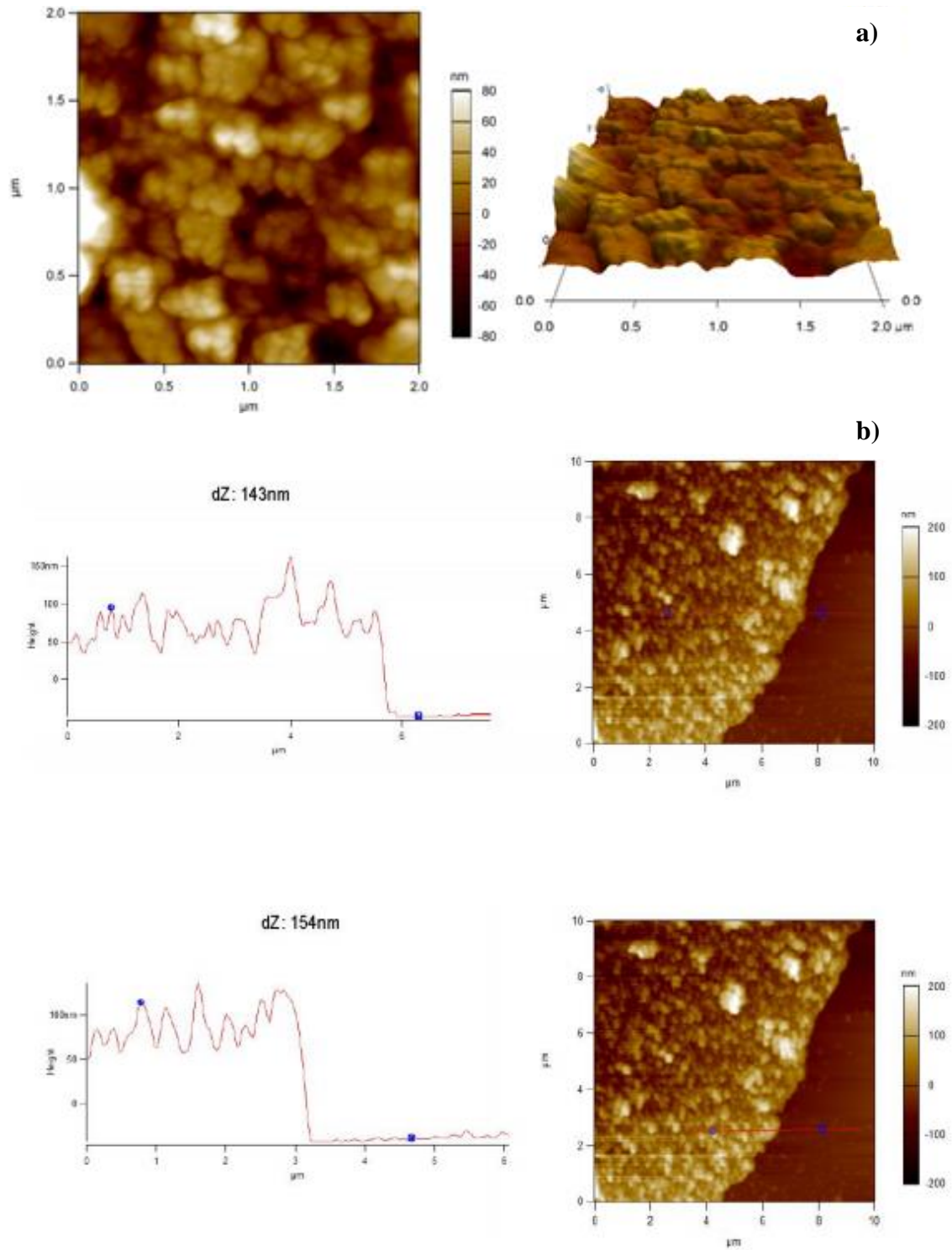
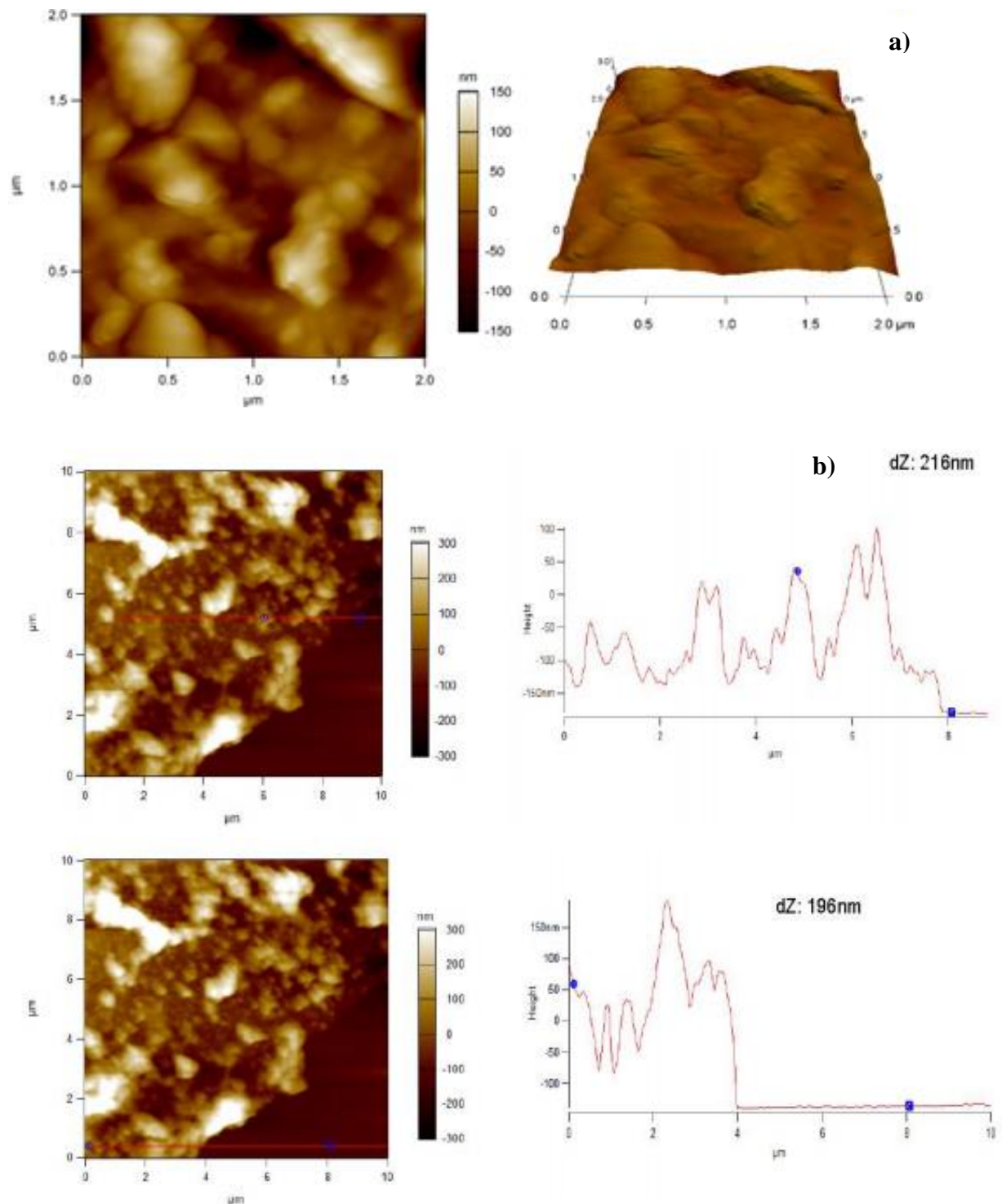


Figura V.13 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de QT/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de QT em pH = 3,5 (NaCl 0,1 mol/L) e CDs pH = 6 (NaCl 0,1 mol/L) (a) altura de uma área de 2 μm x 2 μm , (b) perfil de espessura dos filmes *LbL* ao longo da linha na imagem.

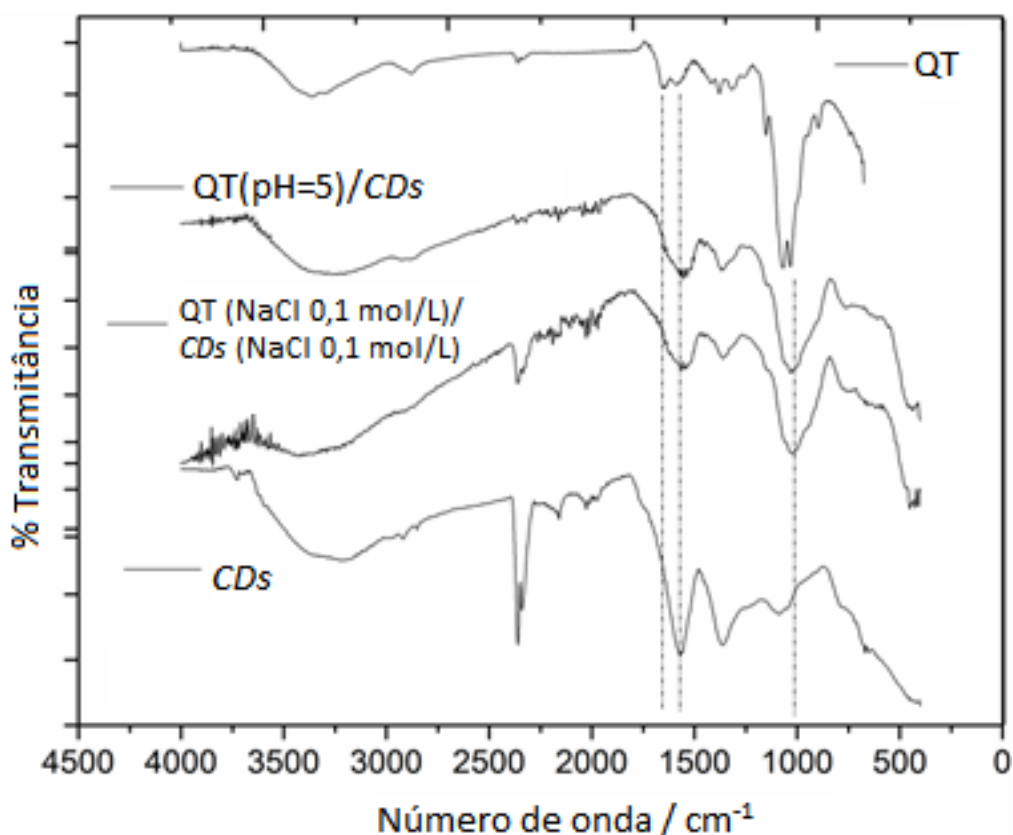


V.3. Interação entre os componentes dos filmes de QT/CDs

A fim de avaliar a interação entre os componentes do filme, utilizou-se a Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF). A Figura V.14 mostra os espectros dos dois componentes utilizados na preparação, bem como os dos filmes *LbL* obtidos em diferentes condições experimentais.

O perfil dos espectros obtidos para o biopolímero QT e para os *CDs* são típicos destes compostos. Os espectros dos filmes mostram as bandas características de ambos (ARAÚJO *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2016b; MESQUITA; DONNICI; PEREIRA, 2010). Em particular, é possível observar a absorção da estrutura sacarídica do biopolímero em torno de 1000 cm^{-1} e diversos grupos funcionais dos *CDs* em torno de 1550 cm^{-1} . Além disso, não foi possível verificar alterações significativas nos espectros, por exemplo, em grupos -NH_3^+ da QT com grupos -COOH dos *CDs*, que mostram as interações entre eles, uma vez que tanto a QT e quanto os *CDs* apresentam absorções nas mesmas regiões do espectro de IVTF.

Figura V.14 – Espectros de IVTF dos *CDs*, QT e filmes *LbL* preparados em diferentes condições experimentais.



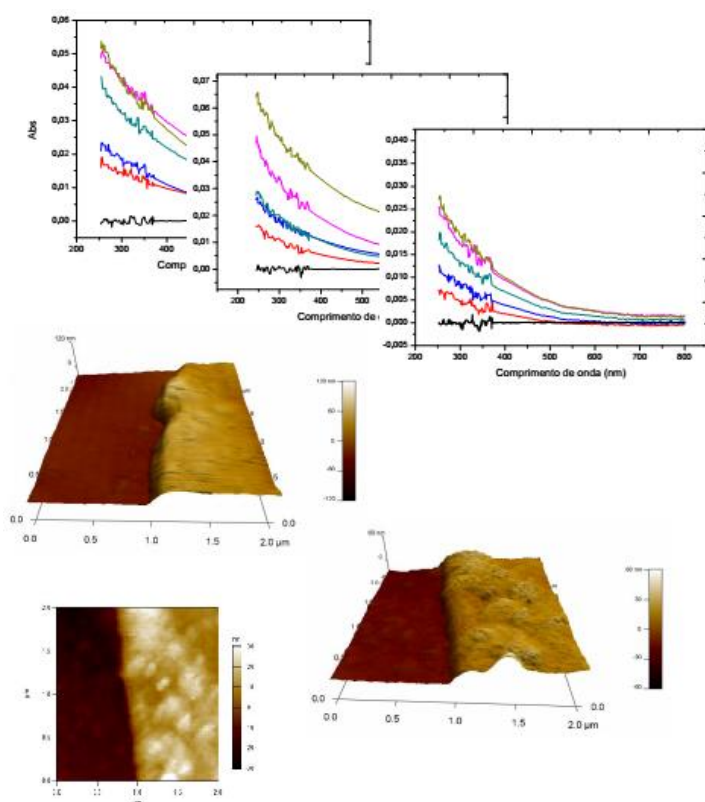
V.4. Conclusões parciais

Com os resultados obtidos, pode-se dizer que técnica de deposição camada por camada foi realizada com sucesso na preparação de novos filmes de multicamadas automontadas com base em QT e *CDs*. Em todas as condições experimentais utilizadas para o crescimento dos filmes, observou-se o crescimento linear com o número de imersões realizadas, sendo que diferentes condições de pH e força iônica produziram filmes com espessura e morfologia diferentes. Em elevados valores de pH e força iônica houve uma maior quantidade de material depositado sobre a camada anterior, levando à formação de filmes mais espessos (Figura V.10). Na Figura V.10 é mostrada uma representação do efeito das condições das soluções de QT e *CDs* nas propriedades gerais dos filmes finos obtidos com a técnica de deposição camada por camada. Estes resultados sugerem que a estrutura do filme, isto é, a morfologia e a espessura, podem ser facilmente controladas e reproduzidas controlando as condições das soluções, além do tradicional número de imersões.

Capítulo VI

Caracterização dos filmes CL/CDs

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos e o principal constituinte presente nos tecidos. Aqui foram preparados filmes automontados entre essa proteína com *Carbon Dots*, a fim de investigar suas propriedades. Neste capítulo são apresentados todos os resultados



obtidos com a caracterização dos filmes automontados preparados a partir das deposições alternadas de CL e CDs. Primeiramente serão apresentados os resultados de espectroscopia na região UV-Vis, em que mostramos o crescimento do filme, monitorando com esta técnica a adsorção das camadas. Em seguida o efeito das condições da solução, diferentes valores de pH e força iônica, na quantidade de nanopartículas depositadas em cada ciclo foi avaliado. A partir destes resultados e da discussão sobre o efeito do pH e da força iônica do

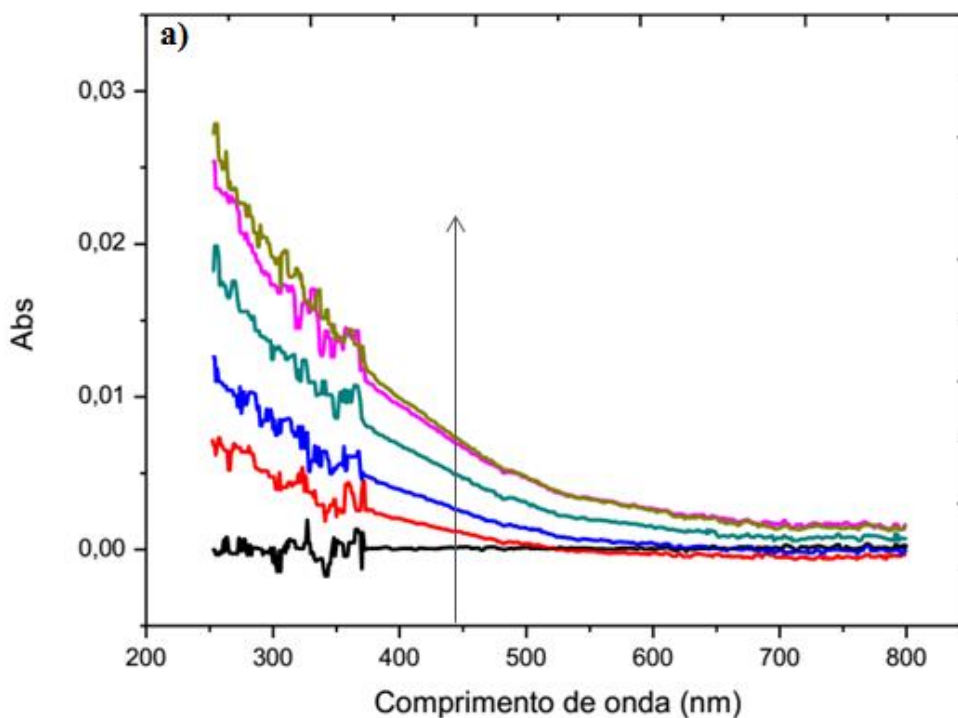
meio na conformação estrutural das cadeias do CL, foi sugerido que a espessura dos filmes pode ser controlada por meio das variações das condições de pH e força iônica das soluções. Em adição, a Microscopia de Força Atômica foi utilizada para a caracterizar a topologia dos filmes obtidos. A seguir, são apresentados os resultados de Titulação Calorimétrica, onde foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos, através da interação entre as soluções utilizadas na preparação do filme. Enfim, neste capítulo é apresentado que filmes automontados com propriedades distintas podem ser preparados por meio do controle das propriedades das soluções em adição ao número de ciclos de imersão.

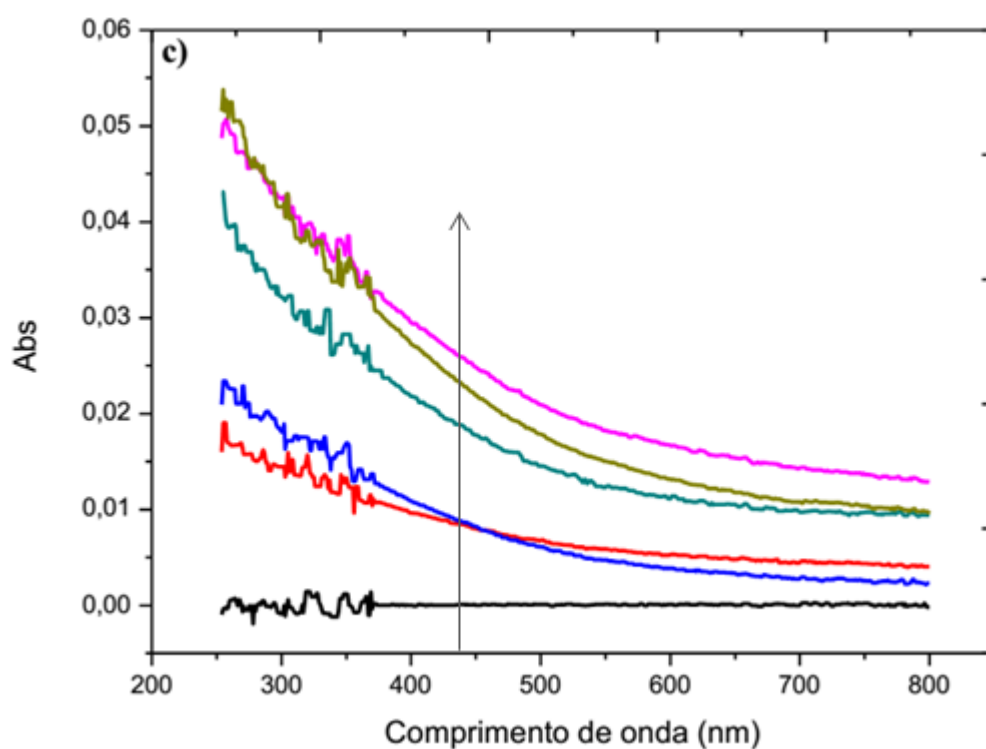
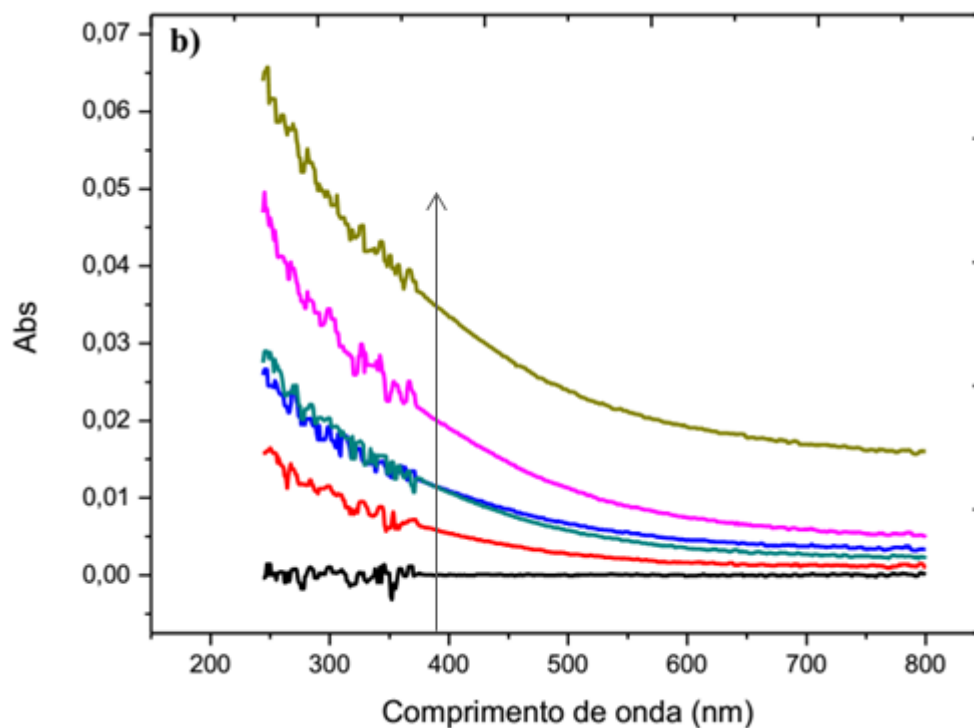
A preparação de nanocompósitos baseados em colágeno tem atraído cada vez mais interesse devido a potencial utilização para fins biomédicos. Como exemplo podemos citar os materiais para implantes e a adsorção de proteínas e células sobre filmes finos para a aplicação em tecidos.

VI.1. Adsorção de camadas e massa depositada dos filmes CL/CDs

Neste trabalho, primeiramente foi verificado se os componentes utilizados eram capazes de interagir para formar filmes automontados que crescem com o aumento do número de imersões. Para acompanhar o crescimento dos filmes foi utilizada a Espectroscopia na Região do UV-Vis. A Figura VI.1 apresenta os espectros de absorção UV-Vis obtidos com diferentes números de bicamadas. Para todas as condições experimentais, pode-se observar um aumento da absorção com o número de bicamadas depositadas. Além disso, verificou-se que o aumento do pH e da força iônica levam a uma maior absorção de radiação em todos os comprimentos de onda.

Figura VI.1 – Espectros UV-Vis dos filmes preparados com soluções de CL em diferentes condições: (a) pH = 3,16 (b) pH = 5,0; c) pH = 3,16 e NaCl 0,1 mol/L. Em (c) as soluções de CL e de CDs foram ajustadas para NaCl 0,1 mol/L. Os espectros correspondem às 0, 4, 8, 12, 16 e 20 bicamadas. A seta indica o crescimento a cada bicamada.

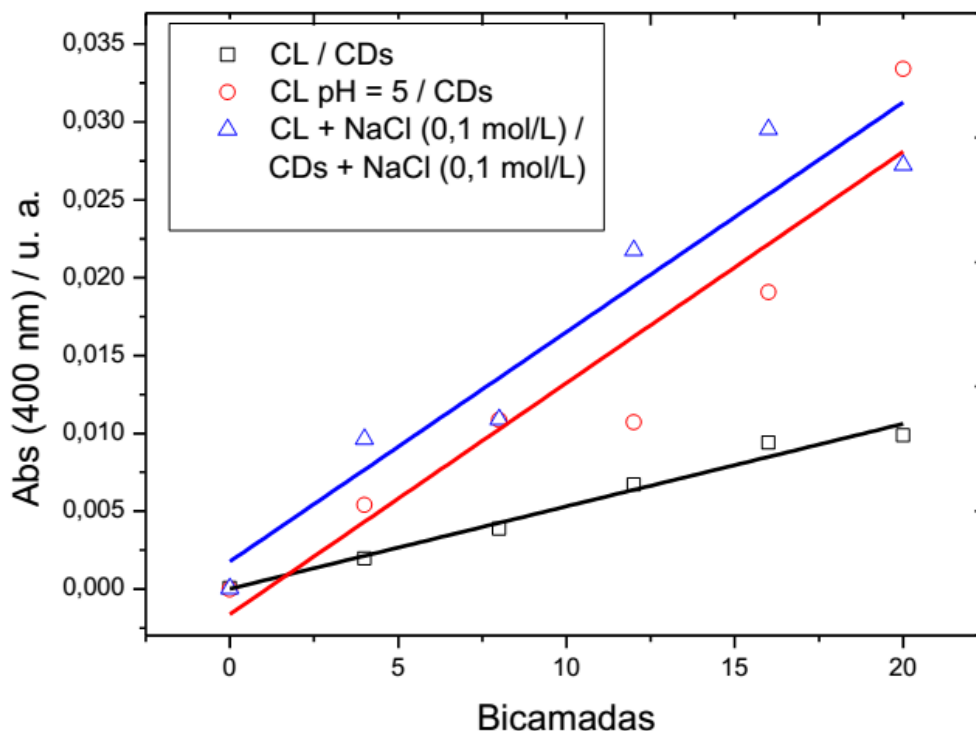




Devido ao maior valor de absorção observado nos filmes com pH e força iônica elevados, acredita-se que a quantidade de material depositado no substrato seja maior. A fim de verificar esta afirmação, o valor de 400 nm foi escolhido para ser representado graficamente em função do número de bicamadas (Figura VI.2). Este comprimento de onda

foi escolhido com base nas características de absorção da radiação dos dois materiais na janela de energia analisada.

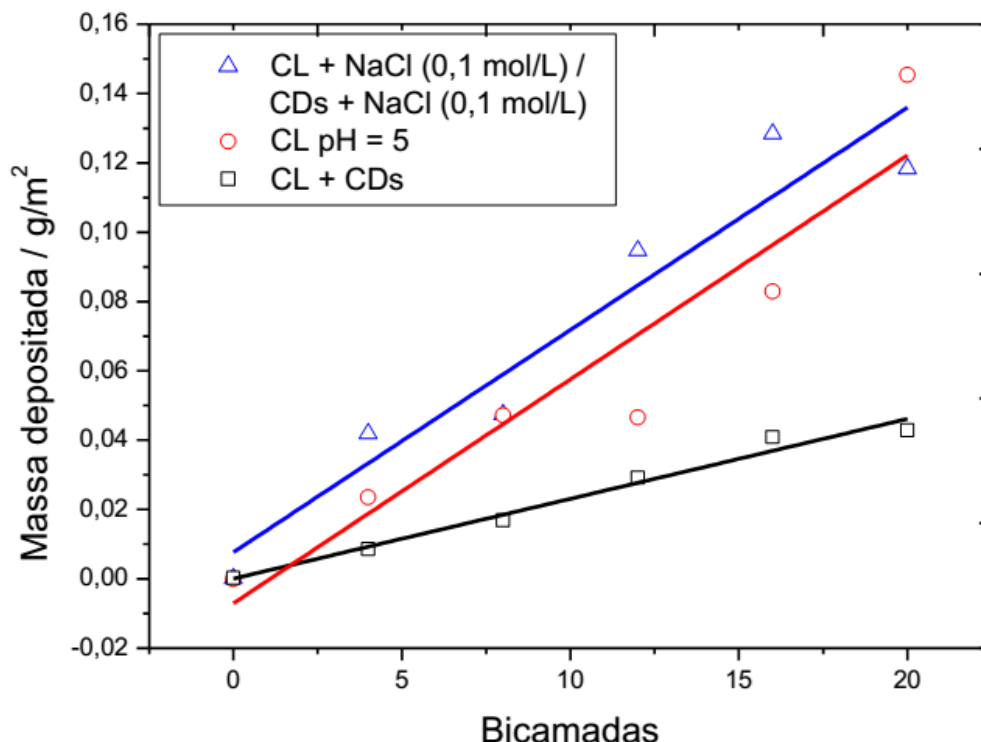
Figura VI.2 – Absorbância em 400 nm em função do número de bicamadas de CL/CDs.



Como discutido no Capítulo IV, em 400 nm, os valores de absorvidade molar encontrados para o CL e os CDs são, respectivamente, $0,045 \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,23 \text{ m}^2/\text{g}$. Portanto, em 400 nm, a absorbância observada é atribuída principalmente aos CDs, sendo de aproximadamente 80 %.

Todos os filmes preparados apresentaram um aumento linear de absorção em 400 nm com o número de bicamadas depositadas, indicando, aproximadamente, a mesma quantidade de material depositado em cada ciclo de adsorção (Figura VI.2). A partir deste resultado e considerando que a absorção em 400 nm é principalmente dos CDs, os valores de absorbância apresentados na Figura VI.2 foram convertidos em valores de massa de CDs depositados (Figura VI.3).

Figura VI.3 – Quantidade de *CDs* depositada em cada ciclo.



A partir da inclinação do gráfico, determinou-se as quantidades de $2,3 \pm 0,2$ mg/m^2 , $6,5 \pm 1,1$ mg/m^2 e $6,4 \pm 0,9$ mg/m^2 de *CDs* depositados em cada ciclo de adsorção para os filmes preparados com soluções de CL em pH = 3,16, pH = 5 e pH = 3,16 na presença de NaCl, respectivamente. Nos filmes de CL/*CDs* com pH e força iônica elevados, pode-se observar que as quantidades de nanopartículas depositadas em cada ciclo são praticamente as mesmas, sugerindo que o efeito do pH e da força iônica não levam à grandes diferenças nas quantidades de material adsorvido, diferentemente dos filmes de QT/*CDs*, em que as quantidades são bem definidas nas diferentes condições, pH e força iônica.

Vários trabalhos têm mostrado que a conformação polimérica afeta significativamente as propriedades dos filmes (LUNDIN *et al.*, 2011; BODDOHI; KILLINGSWORTH; KIPPER, 2008; PINTO *et al.*, 2017). Como a viscosidade está devidamente relacionada com a interação das cadeias poliméricas com solvente e esta interação depende das conformações das cadeias, o estudo do efeito das condições da solução neste parâmetro pode fornecer importantes respostas com relação as características dos filmes obtidos.

Já é sabido que o CL é um biopolímero que contém cargas positivas e negativas devido aos grupos funcionais presentes em suas cadeias e as interações eletrostáticas são relevantes para a estabilidade da conformação da tripla hélice, logo, a conformação é

altamente dependente do pH e da força iônica (FREUDENBERG *et al.*, 2007). Deste modo, foi realizado um breve estudo do efeito de diferentes condições de pH e força iônica sobre a carga superficial e a viscosidade da solução de CL (Figura VI.4) (Tabela VI.1).

Figura VI.4 – Viscosidade das soluções de CL em pH = 3,16, pH = 5,0 e pH = 3,16 + NaCl.

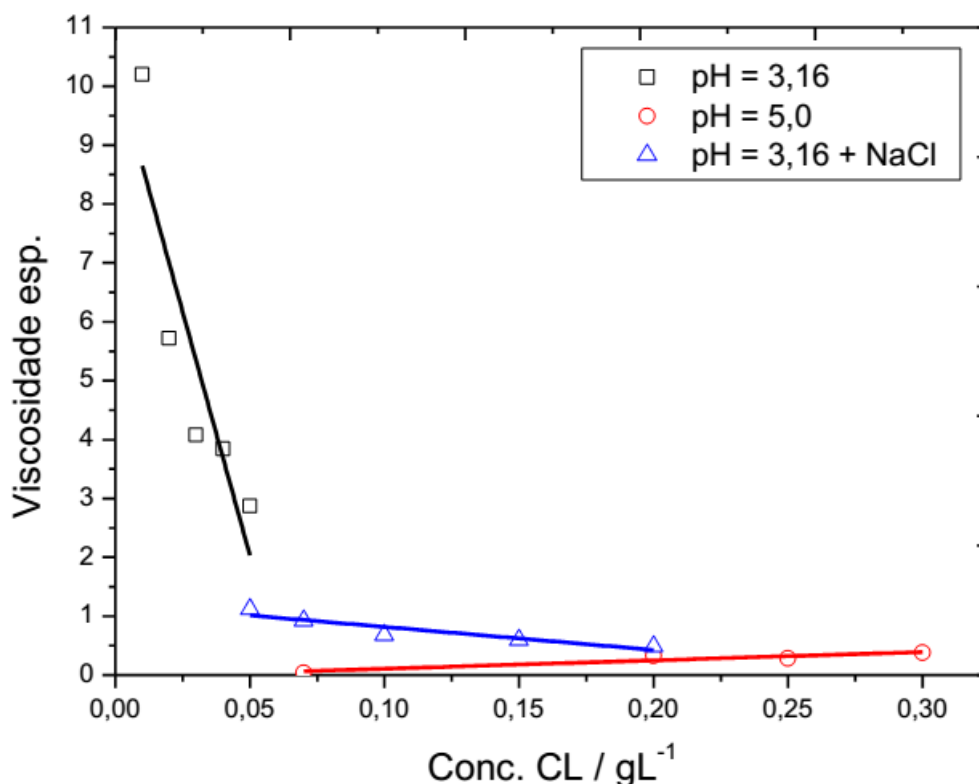


Tabela VI.1 – Viscosidade intrínseca e potencial ζ das soluções de CL em diferentes condições.

Condições das soluções	Viscosidade intrínseca / L/g	Potencial ζ / mV
Ácido acético 3 % (v/v, pH = 3,16)	$10,3 \pm 1,5$	$+28,3 \pm 2,7$
Ácido acético 3 % (v/v, pH = 5,0)	$-0,03 \pm 0,1$	$-1,38 \pm 0,28$
Ácido acético 3 % (v/v, pH = 3,16) e NaCl (0,1 mol/L)	$1,21 \pm 0,1$	$+9,08 \pm 0,81$

Geralmente em soluções de ácido acético o CL (pH ~3,5) apresenta cargas positivas devido aos grupos amino terminais e outros das cadeias laterais dos aminoácidos, por exemplo o anel imidazólico do aminoácido histidina e ϵ -amina de lisina, e os grupos carboxílicos estão em sua maioria neutros, como pode-se verificar no Capítulo IV (Tabela IV.3). Deste modo, as interações entre os grupos funcionais presentes no CL têm um efeito

importante na agregação e na conformação estrutural das cadeias (LI, Y. *et al.* 2014). Sabe-se que as interações eletrostáticas são importantes para sua flexibilidade, logo aumentando-se a força iônica ocorre a estabilização das cargas e aumentando-se o pH existe uma queda na quantidade de grupos protonados, gerando conformações mais flexíveis (FREUDENBERG *et al.*, 2007).

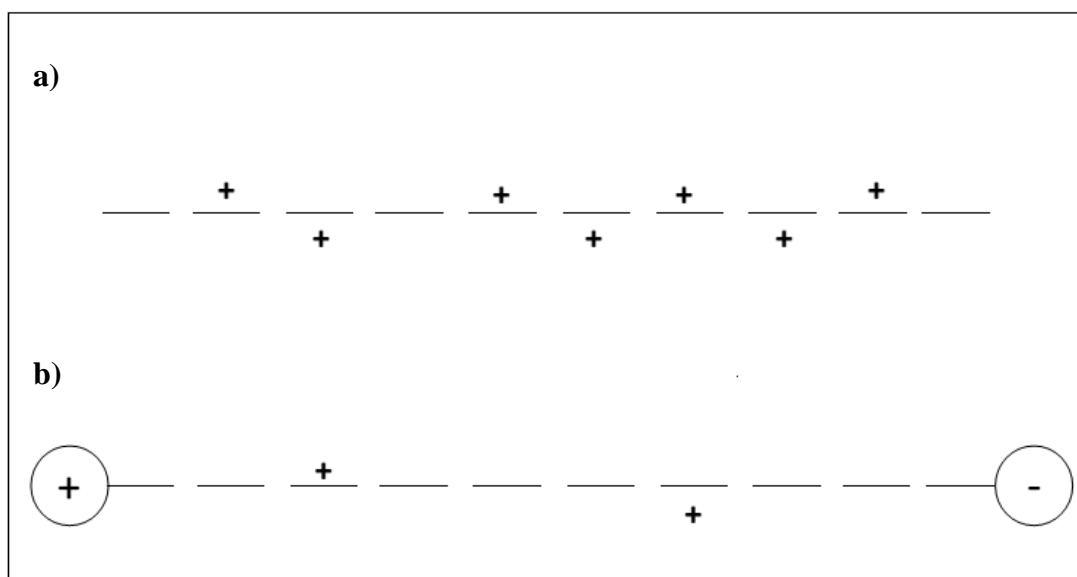
Em pH = 3,16, os grupos amino e imidazólicos estão protonados ($-\text{NH}_3^+$, $>\text{NH}^+$), gerando um valor de potencial ζ de +28,3 mV, logo existe uma repulsão entre as cadeias, gerando conformações mais rígidas. Quando o pH é elevado resulta em um menor valor de potencial ζ , -1,37, que permite uma maior flexibilidade e interação entre as cadeias. Com o aumento da força iônica da solução, em pH = 3,16 na presença de NaCl 0,1 mol/L, o potencial ζ diminui, devido aos efeitos de blindagem eletrostática. De modo semelhante, gera conformações mais flexíveis que resultam em um aumento nas interações entre as cadeias. Como apresentado anteriormente, em polieletrólitos flexíveis, como o CL, um aumento da força iônica pode levar a uma diminuição da viscosidade da solução, que pode ser justificado pelas forças intermoleculares (LI, Y. *et al.*, 2014).

Para o CL o número de cargas positivas diminui com o aumento do pH e o aumento da força iônica. Como consequência tem-se cadeias mais flexíveis devido a diminuição das repulsões eletrostáticas. Deste modo, as viscosidades intrínsecas das diferentes soluções, apresentadas na Tabela VI.1, estão de acordo com valores esperados. Porém, apesar do valor encontrado da viscosidade intrínseca da solução de pH = 5 ser inferior ao da solução de pH = 3,16, o valor encontrado não está totalmente de acordo devido ao mesmo ser negativo. Na literatura, Li e colaboradores verificaram anormalidades no comportamento da viscosidade em soluções diluídas de CL devido a fatores como adsorção de solutos poliméricos nas paredes do capilar do viscosímetro e a forças eletrostáticas intermoleculares de longo alcance (LI, Y. *et al.*, 2014). Portanto, em pH e força iônica elevada, as cadeias de polímeros são menos carregadas e nestas condições são permitidas conformações mais flexíveis e maiores interações intra e intermoleculares, levando à formação de estruturas maiores que geram camadas mais espessas, devido a maior quantidade de material depositado.

Em comparação, a quantidade de massa depositada nos filmes CL/CDs é menor do que a quantidade encontrada nos filmes de QT/CDs, isso se deve às diferenças entre os polieletrólitos (Figura VI.5). A interação existente entre a QT e os CDs é maior, quando comparamos os filmes com as mesmas condições, devido ao biopolímero ter uma maior

quantidade de cargas positivas em sua cadeia se comparada ao CL, consequentemente há uma maior quantidade de material adsorvido. Esta observação também se encontra em outros trabalhos utilizando-se outro tipo de nanopartículas (MESQUITA *et al.*, 2010; MESQUITA *et al.*, 2011).

Figura VI.5 – Representação das cargas dos biopolímeros: (a) QT; (b) CL.



Sabe-se que o aumento da massa depositada de *CDs* com o aumento do pH e da força iônica pode ser associado a uma maior quantidade de CL depositada e/ou ao aumento da massa depositada das nanopartículas (Figura VI.1). Diferentemente do CL, os *CDs* não apresentam variação em sua estrutura, portanto é necessário fazer o estudo das cargas em sua superfície a fim de verificar o efeito na formação dos filmes. Deste modo, filmes *LbL* foram preparados sob diferentes condições de força iônica da solução de *CDs*. Os espectros obtidos para os filmes são apresentados na Figura VI.6, a absorbância e as massas depositadas são mostradas na Figura VI.7.

Figura VI.6 – Espectros UV-Vis dos filmes preparados em diferentes condições: (a) CL pH = 3,16 e solução de CDs; (b) CL pH = 3,16 e solução de CDs (NaCl 0,1 mol/L). Solução de CDs pH = 6. Os espectros apresentados correspondem às 0, 4, 8, 12, 16 e 20 bicamadas. A seta indica o crescimento a cada bicamada.

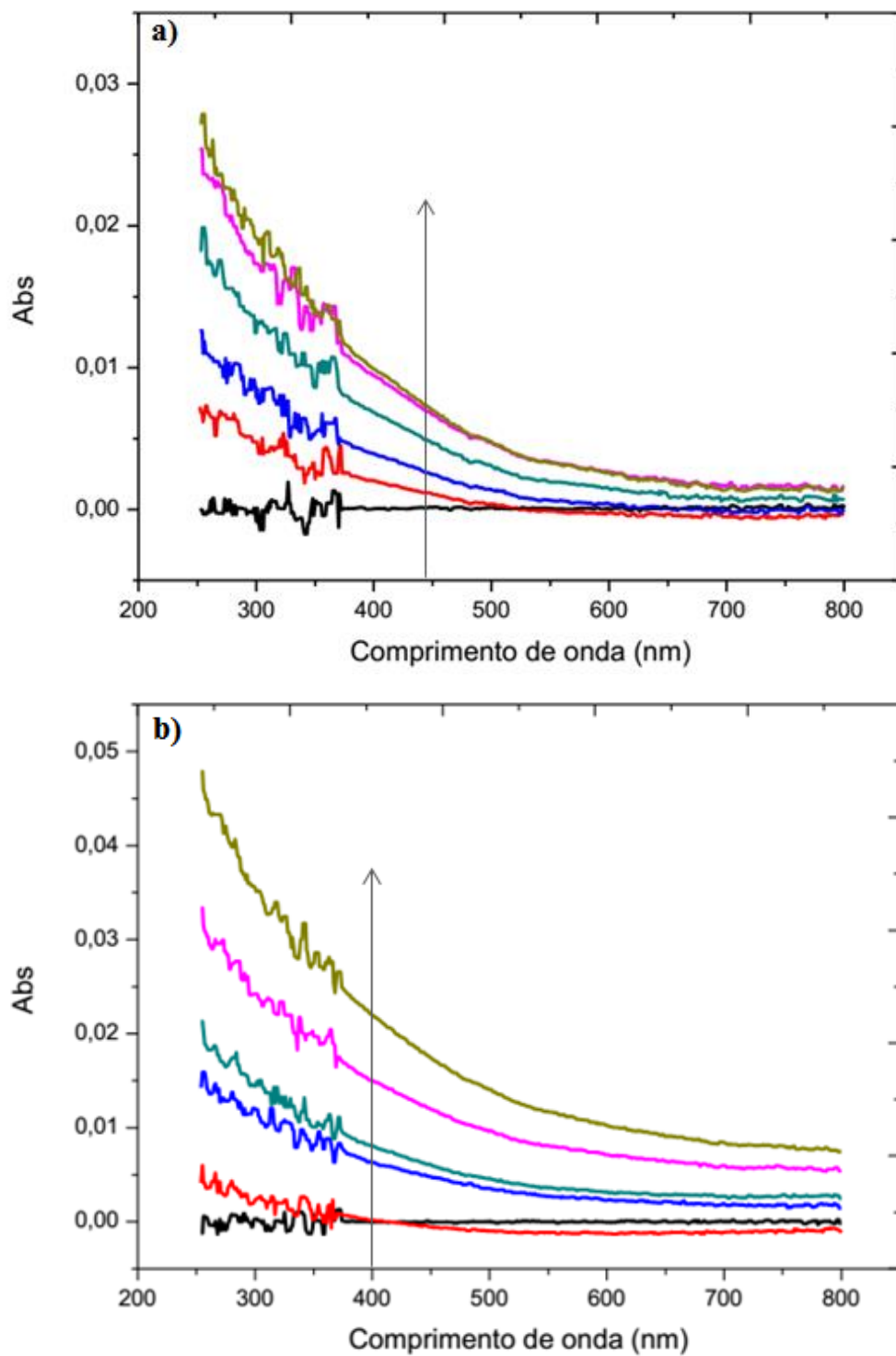
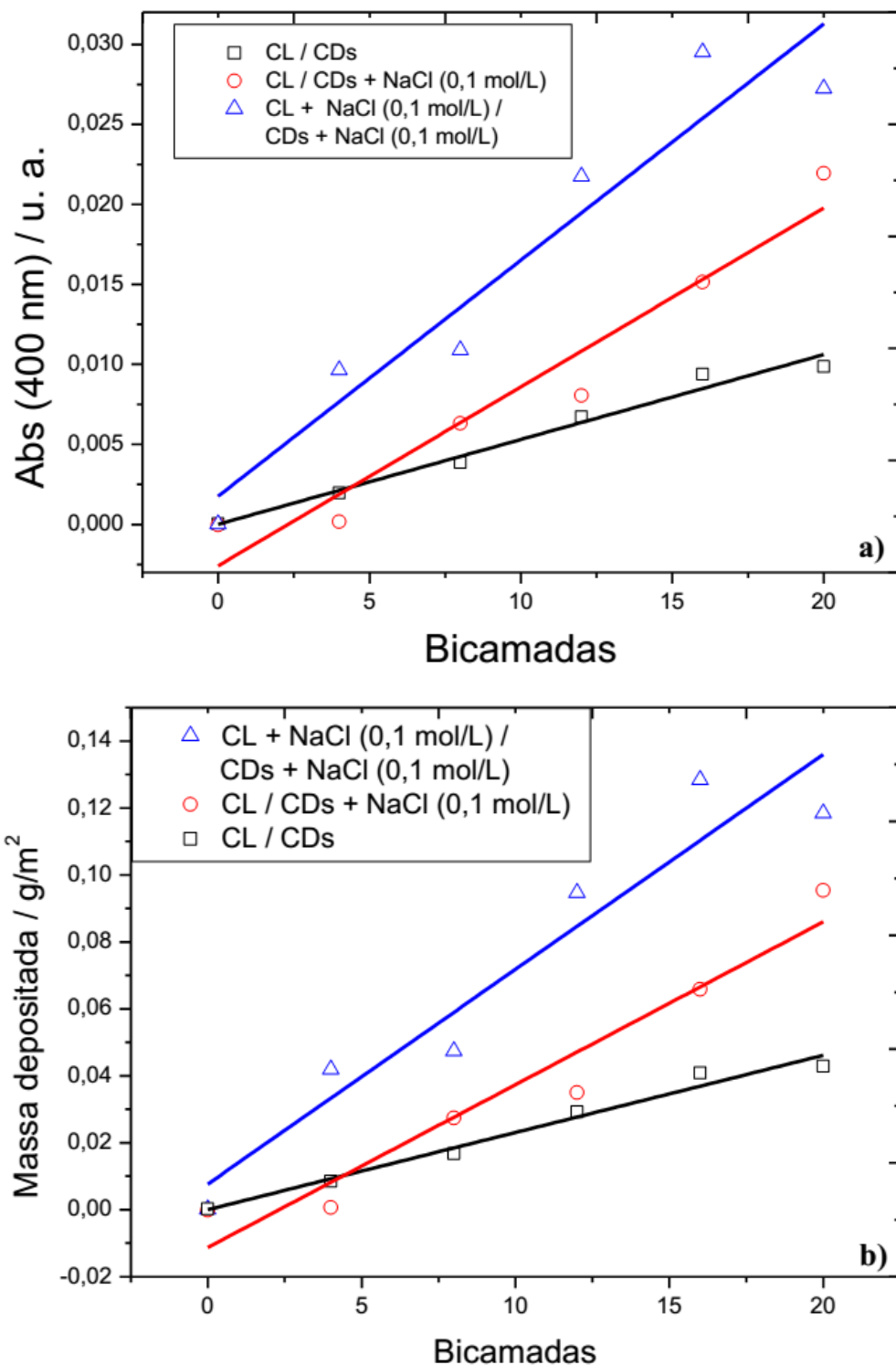


Figura VI.7 – (a) Absorbância em 400 nm em função do número de bicamadas de CL/CDs; (b) Efeito da força iônica das soluções de CL e de CDs na quantidade de massa de CDs depositada.



As quantidades de material depositado foram de $2,3 \pm 0,2 \text{ mg/m}^2$, $4,9 \pm 0,6 \text{ mg/m}^2$ e $6,4 \pm 0,9 \text{ mg/m}^2$ para os filmes preparados com soluções aquosas de CDs com força iônica diferentes. Pode ser observado que o aumento da força iônica da solução de CDs gera um

aumento na quantidade de material depositado (símbolos preto e vermelho na Figura VI.7b). Esta quantidade é ainda maior quando a força iônica de ambas as soluções é elevada (Figura VI.7b), sugerindo que a força iônica da solução de *CDs* influencia na quantidade de nanopartículas depositada em cada camada. Como discutido no Capítulo V, a presença de íons em solução influencia na estabilidade das suspensões de nanoestruturas de carbono (LIN *et al.*, 2009), sendo que o aumento da força iônica na suspensão de *CDs* estabiliza as cargas em sua superfície reduzindo o potencial ζ (Tabela VI.2), consequentemente, existe uma maior interação entre os mesmos e uma maior agregação, resultando na adsorção de aglomerados.

Tabela VI.2 – Potencial ζ obtido para os *CDs* em diferentes condições em solução aquosa.

	<i>CDs</i>
Potencial ζ / mV	$-47 \pm 17^*$
	$-8,9 \pm 1,2^{**}$

* pH = 5,4; ** pH = 5,4 e força iônica de 0,1 mol/L.

Portanto, além da adsorção de aglomerados de *CDs*, acredita-se que o aumento do material depositado está relacionado com o aumento da flexibilidade das cadeias do biopolímero em pH e força iônica mais elevados. Devido à maior flexibilidade do CL nestas condições, as cadeias poliméricas podem apresentar conformações mais adequadas para a adsorção sobre a superfície quase esférica dos *CDs*, gerando filmes com uma maior quantidade de material depositado.

VI.2. Morfologia e espessura dos filmes CL/*CDs*

Como apresentado pela técnica de espectroscopia UV-Vis, as condições das soluções afetam as quantidades de CL e *CDs* depositados nas camadas dos filmes preparados. Então, a fim de avaliar a estrutura da superfície e a espessura dos filmes automontadas de CL/*CDs*, a Microscopia de Força Atômica (MFA) foi utilizada. Como mostra a Figura VI.8, Figura VI.9, Figura VI.10 e Figura VI.11 os filmes preparados em lâminas de vidro resultaram em estruturas similares a pequenas cadeias de montanhas e vales. No entanto, as topografias observadas nas amostras são diferentes.

No filme preparado em pH = 3,16 e força iônica baixa (Figura VI.8), é possível observar uma topografia mais lisa com um certo alinhamento, sugerindo que os *CDs*

depositados são revestidos pelo CL de forma eficiente e que as cadeias poliméricas são adsorvidas de forma ordenada, alinhada.

Com o aumento do pH para 5 (Figura VI.9), a morfologia do filme apresenta-se com pequenos aglomerados, sugerindo a adsorção de aglomerados de *CDs* e/ou a adsorção das cadeias mais flexíveis do CL, em adição pode-se observar um alinhamento parecido com o encontrado no filme em pH mais baixo que sugere o alinhamento das cadeias poliméricas.

No filme com pH baixo e força iônica elevada da solução de *CDs* (Figura VI.10), é possível observar a formação de fibras. Com a elevação da força iônica de ambas as soluções pode-se observar a formação de fibras em maior quantidade (Figura VI.11).

Ambos os filmes apresentaram rugosidade média (RMS) entre 5 e 11 nm, sendo que o filme com pH e força iônica baixos, e o filme com pH elevado, apresentaram uma espessura de entre 40 e 50 nm, para filmes de 20 bicamadas. Estes valores são muito menores que os observados para os filmes preparados com QT. Por outro lado, os filmes utilizando CL estão aderidos mais fortemente ao vidro sendo mais difícil medir sua espessura por MFA, por este motivo as medidas de espessura dos filmes com força iônica elevadas não foram realizadas.

Figura VI.8 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de CL/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de CL em pH = 3,5.

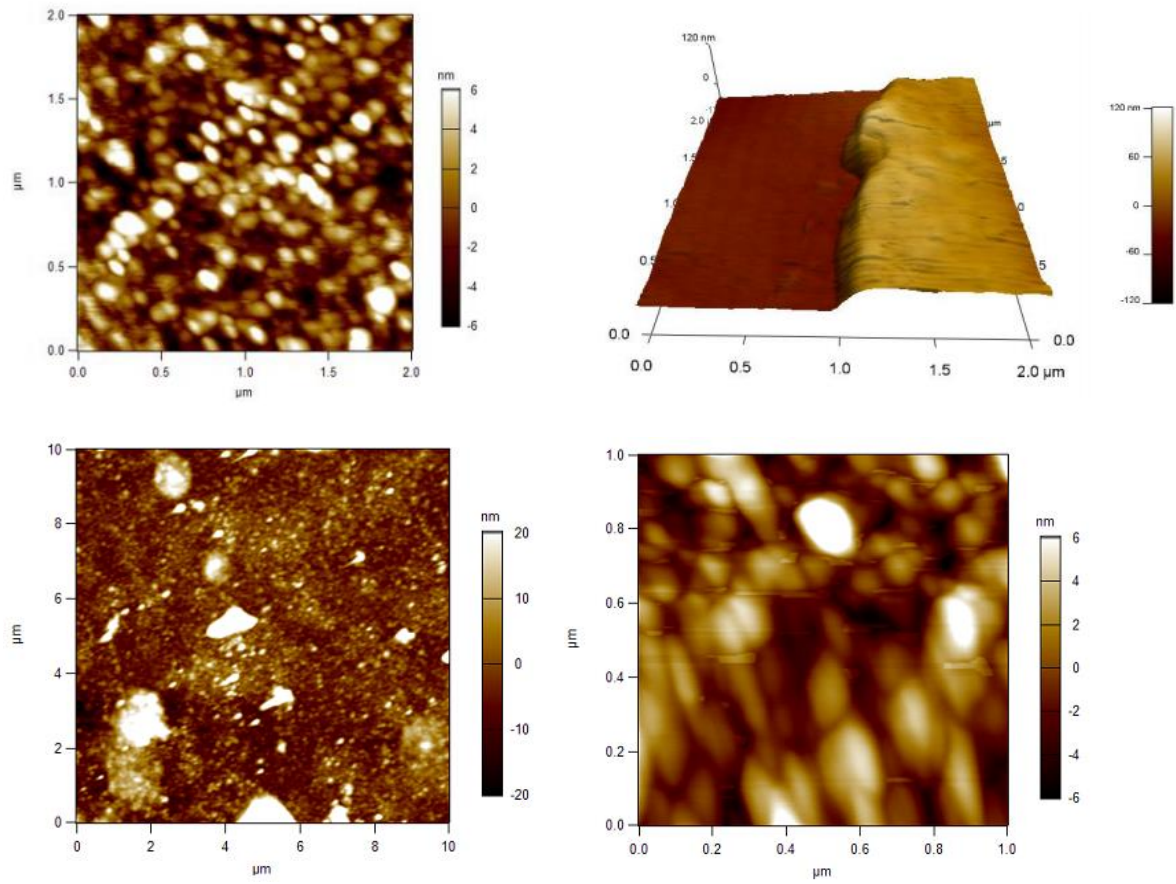


Figura VI.9 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de CL/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de CL em pH = 5.

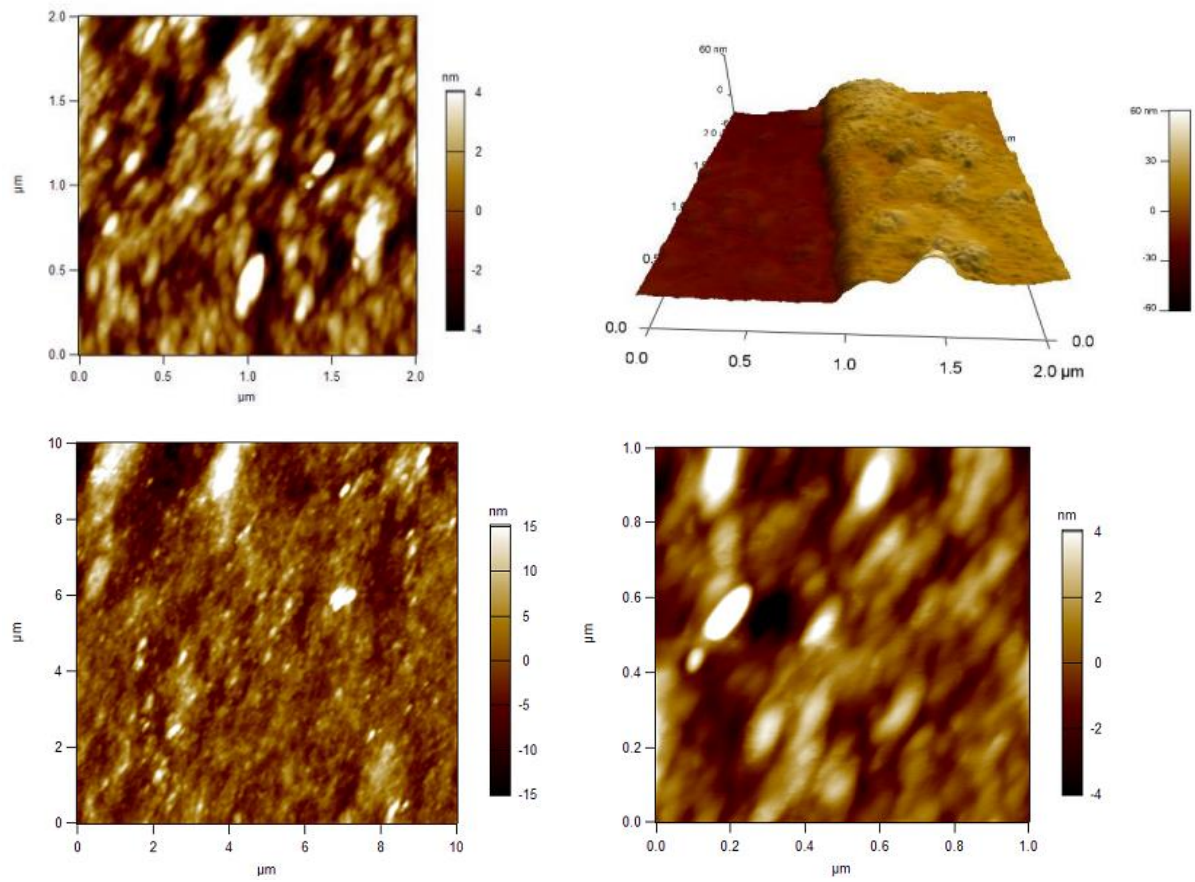


Figura VI.10 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de CL/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de CL em $\text{pH} = 3,5$ e CDs com força iônica elevada, $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol/L}$.

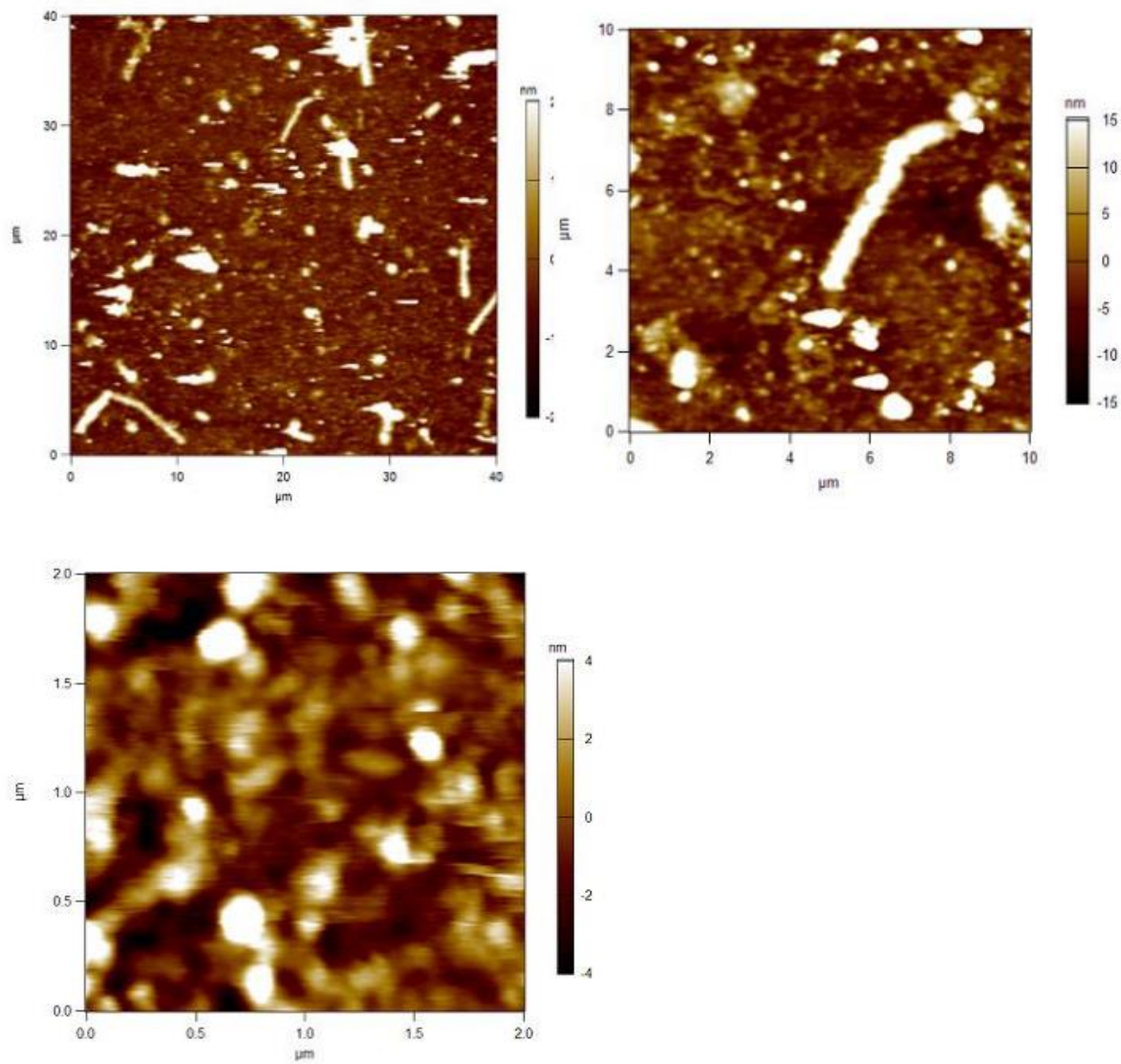
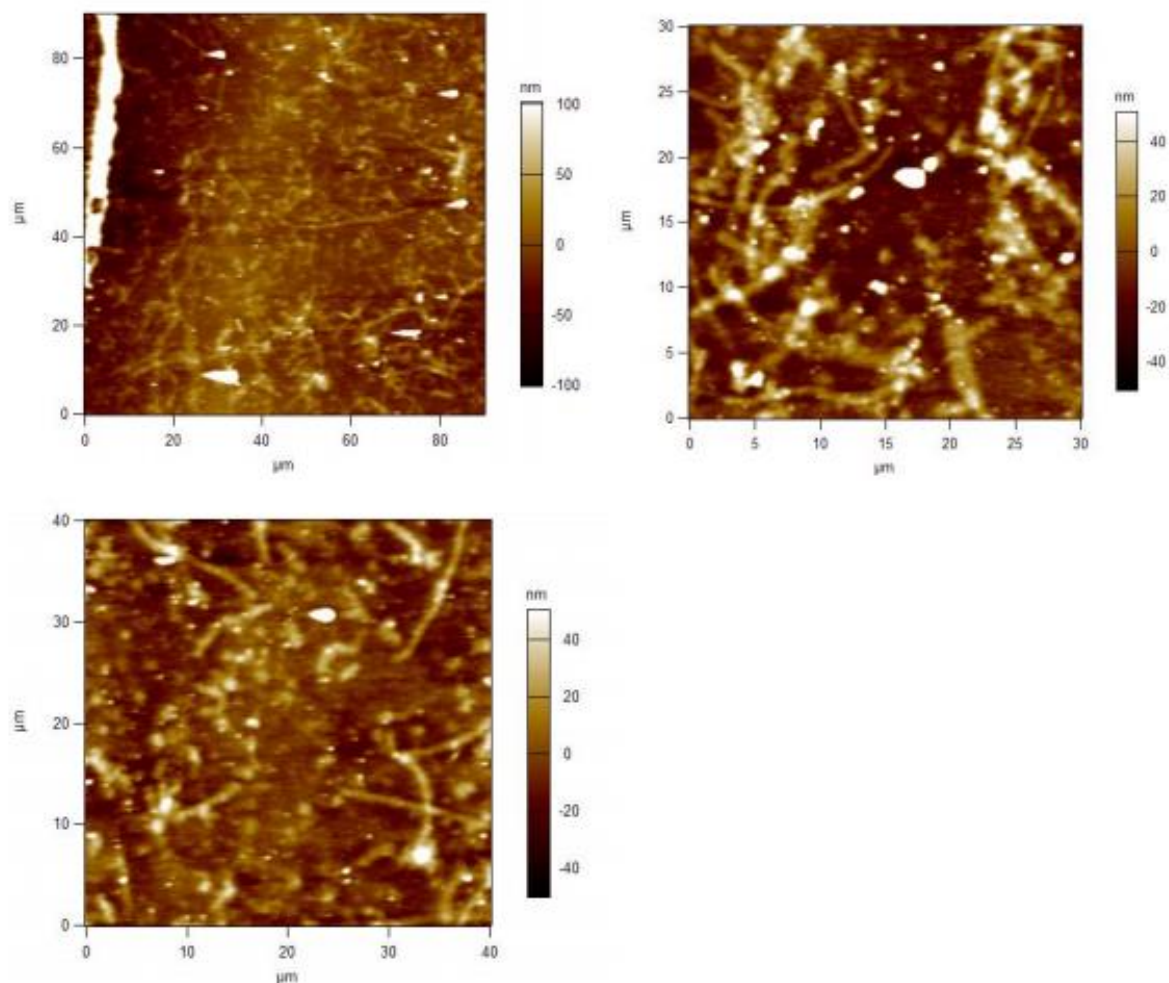


Figura VI.11 – Imagens de MFA para um filme de 20 bicamadas de CL/CDs preparados em um substrato de vidro utilizando solução de CL em pH = 3,5 e CDs, ambos com força iônica elevada, NaCl 0,1 mol/L.



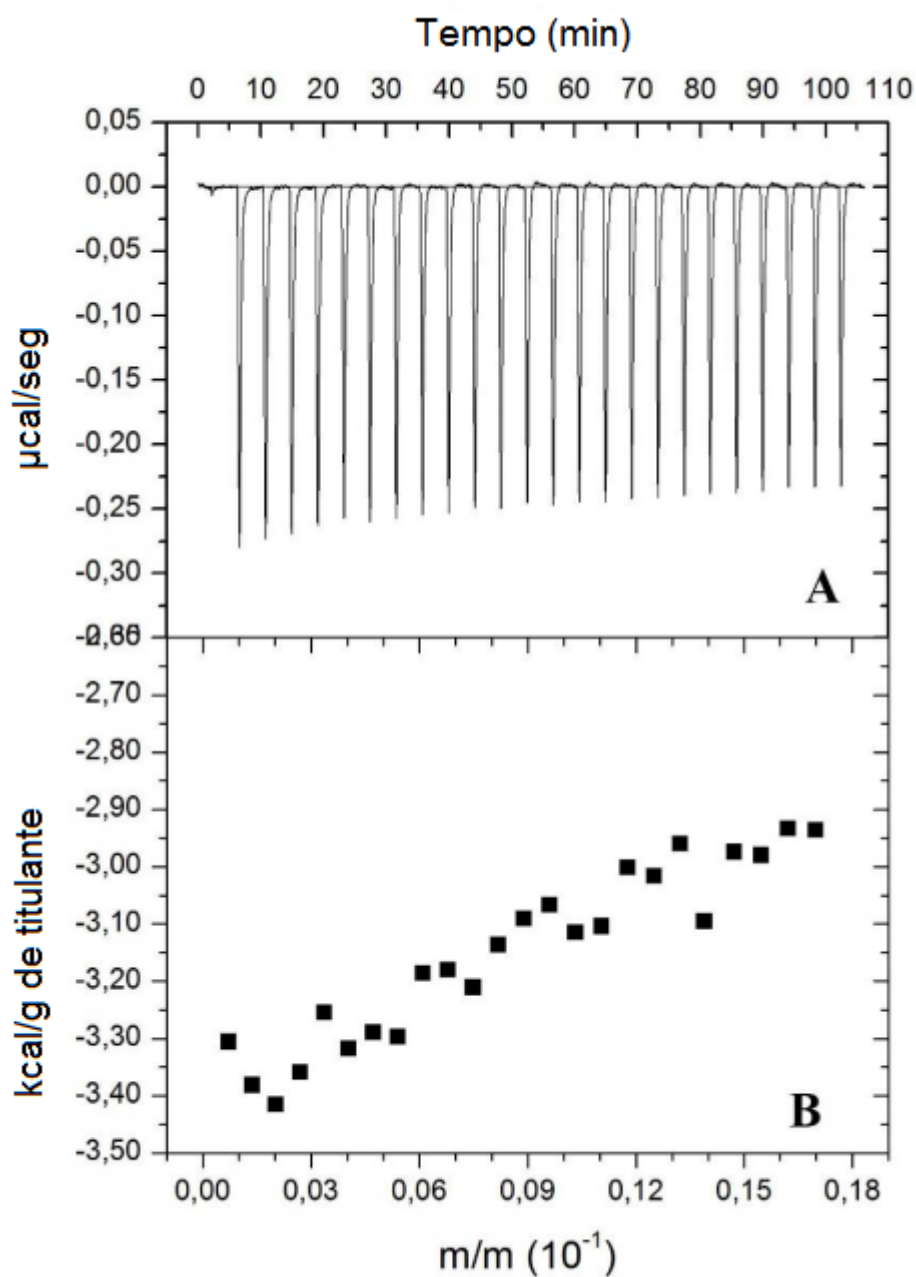
VI.3. Análise termodinâmica

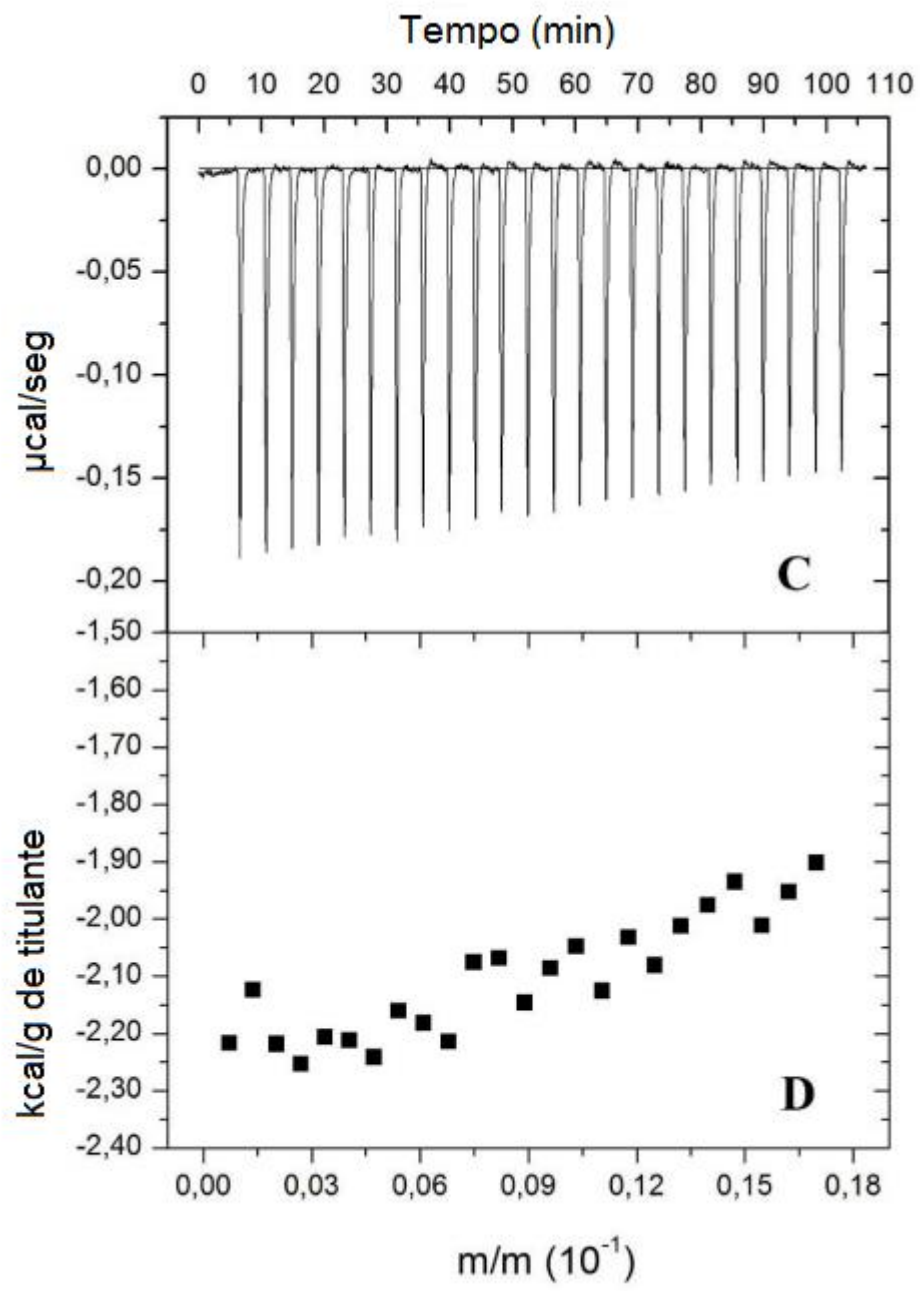
A fim de avaliar o efeito das diferentes condições das soluções de CL na interação com as nanopartículas de carbono, foram determinados os valores das entalpias usando a calorimetria de titulação isotérmica. Na Figura VI.12 são mostrados os resultados obtidos com a titulação de CDs sobre as soluções CL nas diferentes condições: (i) pH = 3,2 (Figura VI.12A e Figura VI.12B); (ii) pH = 5 (Figura VI.12C e Figura VI.12D); e (iii) pH = 3,2 com força iônica elevada, NaCl 0,1 mol/L (Figura VI.12E e Figura VI.12F).

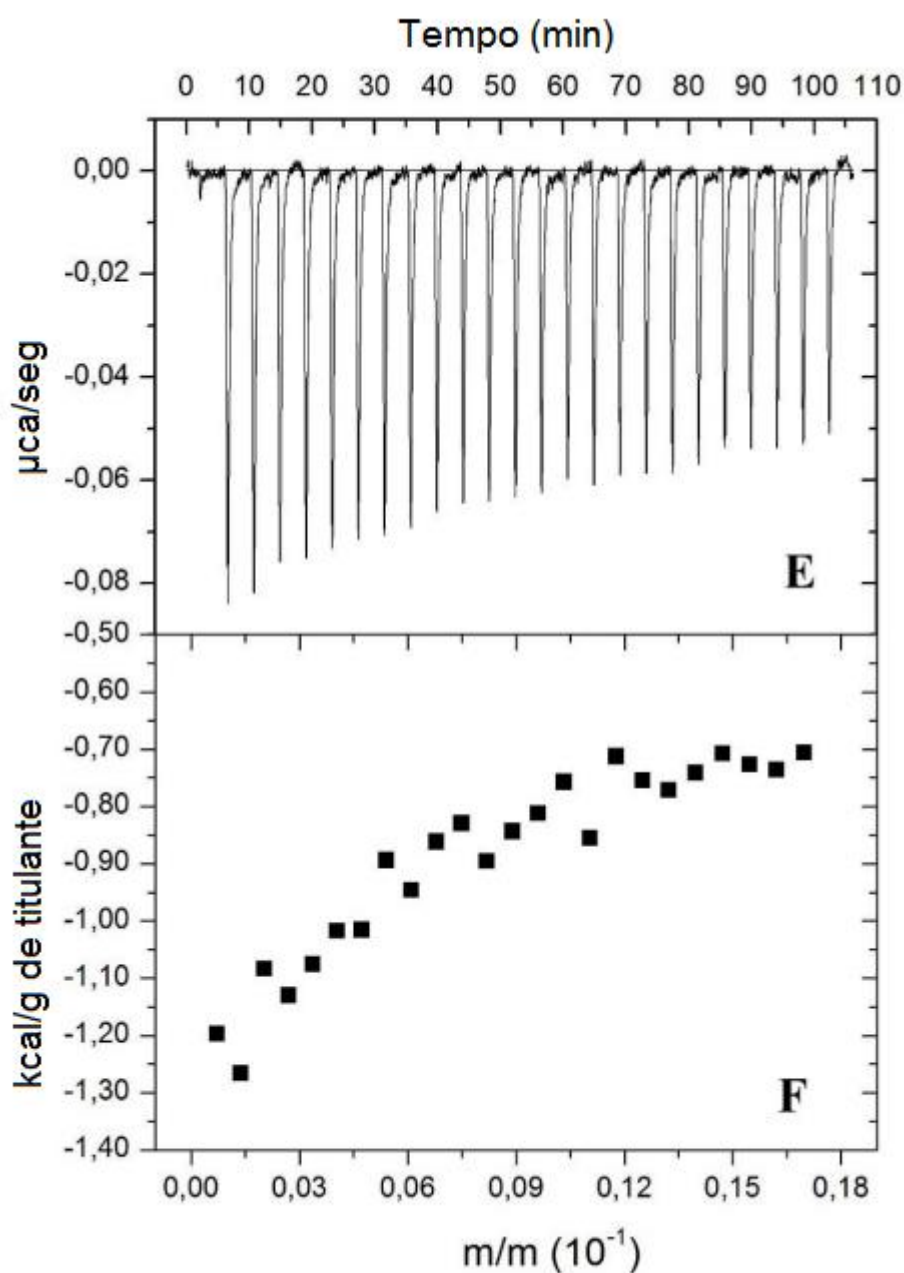
Em todos os experimentos, as entalpias exotérmicas indicam que as interações eletrostáticas entre CDs-CL são importantes para o processo de ligação, em concordância com os resultados obtidos nas análises de potencial ζ (Tabela VI.1 e Tabela VI.2) (Figura VI.13), que mostraram cargas predominantemente negativas para os CDs e cargas positivas para o CL. Ou seja, a superfície hidrofílica dos CDs apresenta uma alta densidade de cargas

aniônicas globais que contribui efetivamente na associação com o CL carregado positivamente.

Figura VI.12 - Calorimetria de titulação isotérmica de 0,21 g/L de CDs e 2,25 g/L de CL diluídos em ácido acético 3 % (v/v) pH = 3,16 (A e B), ácido acético 3 % pH = 5 (C e D) e ácido acético 3 % pH = 3,16 com força iônica elevada, NaCl 0,1 mol/L (E e F). Fluxo de calor para cada injeção de CDs em função do tempo (dados brutos). (B, D e F) Entalpia em função da razão molar entre CDs e CL. A linha de base foi corrigida e o calor de diluição subtraído de cada ponto experimental.



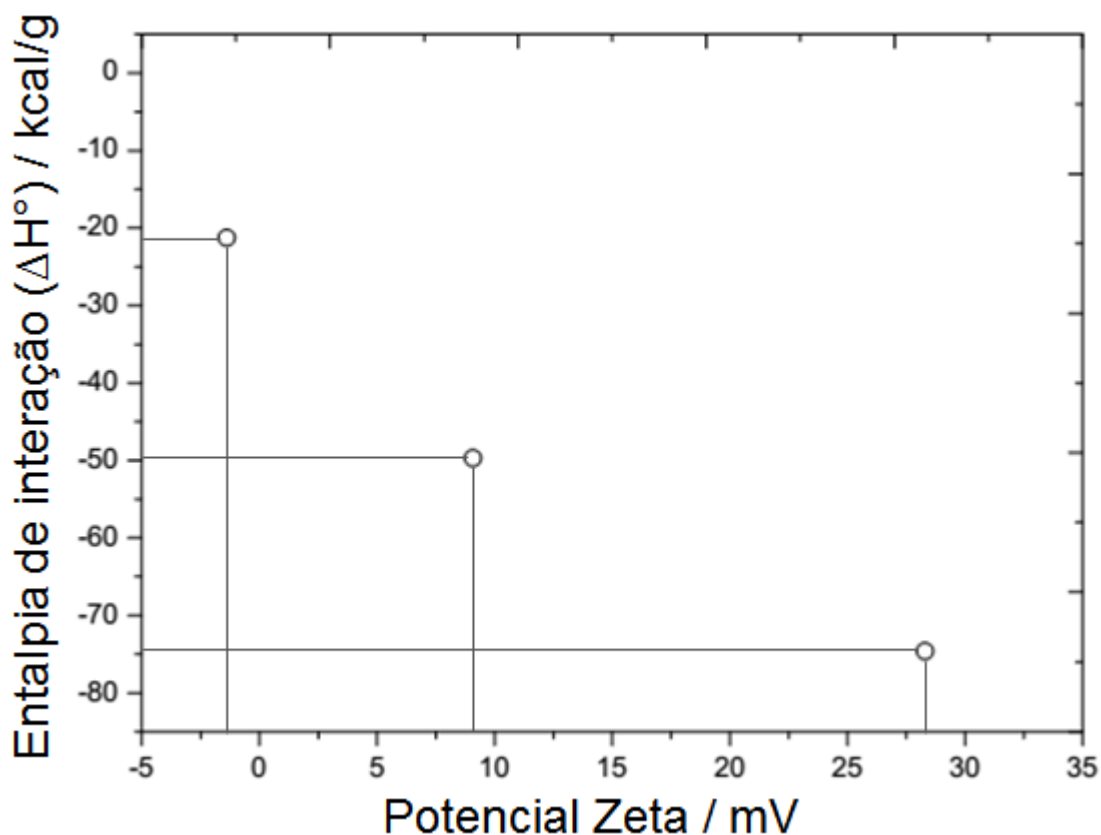




Embora tenham sido observados comportamentos semelhantes em todas as condições, a magnitude da entalpia de interação obtida para os *CDs* na presença de solução de CL é muito maior em solução de ácido acético com pH = 3,2 ($\Delta H^\circ = -74,63$ kcal/g) do que os valores obtidos para os *CDs* sobre a solução CL em força iônica elevada ($\Delta H^\circ = -49,74$ kcal/g). O aumento da força iônica, promovida pela presença de NaCl, resulta na blindagem eletrostática sobre as cargas superficiais do CL (LOCKHART; KIM, 1993) e, conseqüentemente, diminui a interação eletrostática entre *CDs* e biopolímero.

Por outro lado, os dados brutos obtidos para o ensaio de *CDs* e CL em solução de ácido acético com $\text{pH} = 5$ mostram uma associação completamente diferente quando comparado ao CL em solução de ácido acético em pH mais baixo. Notavelmente, a interação entre *CDs*-CL na presença de ácido acético com $\text{pH} = 3,2$ é mais aparente do que na solução de ácido acético com pH elevado. A entalpia calculada para a interação entre estes componentes na presença de solução de ácido acético com $\text{pH} = 3,2$ ($\Delta H^\circ = -74,63 \text{ kcal/g}$) excede a entalpia de 3 a 4 vezes, se comparado com a solução de ácido acético com $\text{pH} = 5$ ($\Delta H^\circ = -21,26 \text{ kcal/g}$). Estes resultados sugerem uma menor contribuição eletrostática para o valor de entalpia, estando acordo com as medidas de potencial ζ que apresenta menor carga superficial no CL em $\text{pH} = 5$, em comparação com $\text{pH} = 3,2$ (Tabela VI.1). Em adição, quando foram adicionadas alíquotas de *CDs* ao CL em solução de ácido acético com $\text{pH} = 5$, foi possível observar uma diminuição do respectivo calor de reação (δh_i) até valores que não podem ser distinguidos do calor de diluição dos *CDs* na mesma solução de ácido acético, confirmando a menor interação entre *CDs*-CL sob esta condição.

Figura VI.13 – Relação entre Potencial Zeta e Entalpia de interação.



VI.4. Conclusões parciais

A técnica de deposição camada por camada foi realizada com sucesso na preparação de novos filmes automontadas com base em CL e *CDs*, sendo possível observar um crescimento linear com o número de imersões realizadas, sendo que diferentes condições das soluções, pH e força iônica, levaram a formação de filmes com morfologias diferentes. Em elevados valores de pH e força iônica houve uma maior quantidade de material depositado sobre a última camada, no entanto, a energia de interação, obtida por calorimetria isotérmica, é maior em pH e força iônica mais baixos. Em contraste, diferentemente dos filmes QT/*CDs*, os filmes utilizando CL não apresentaram diferenças significativas na quantidade de massa depositada e na espessura entre os filmes de pH e força iônica elevados. Nos filmes utilizando QT estes valores são significativamente diferentes. Em adição, os filmes também apresentaram valores de espessura inferiores, quando comparados aos filmes de QT/*CDs*.

Capítulo VII

Conclusão

Carbon Dots (CDs) obtidos partir de celulose de algodão e contendo 4,5 mmol/g de grupos funcionais ácidos foram usados na preparação de filmes automontados, utilizando a técnica *LbL*, com os biopolímeros QT e CL a fim de verificar a morfologia, espessura e interações moleculares entre os componentes. A QT usada apresentou um total de 4,2 mmol/g de grupos funcionais $-NH_2$, correspondente a um grau de desacetilação de aproximadamente 70 %. Por outro lado, o CL hidrolisado apresentou diferentes grupos funcionais com acidez de Brønsted, típicos da presença de diferentes aminoácidos na estrutura.

A técnica de deposição camada por camada foi realizada com sucesso na preparação de novos filmes de multicamadas automontadas com base em biopolímeros e CDs. Em todas as condições experimentais utilizadas para o crescimento dos filmes, observou-se o crescimento de um filme linear com o número de imersões realizadas. No entanto, diferentes condições dos biopolímeros, QT e CL, e da suspensão de CDs, ou seja, pH e força iônica, produziram filmes com espessura e morfologia diferentes.

Nos filmes de QT/CDs e CL/CDs preparados, observou-se que elevados valores de pH e força iônica proporcionam uma maior quantidade de material depositado sobre a camada anterior, levando à formação de filmes mais espessos. Acreditamos que este resultado está relacionado com o aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas dos biopolímeros, cobrindo mais eficientemente a estrutura das nanopartículas quase esféricas. Além disso, o aumento da força iônica nos filmes leva à deposição de uma maior quantidade de CDs, devido à formação de aglomerados sob estas condições.

Nos filmes QT/CDs a quantidade de nanopartículas depositadas por bicamada e a espessura do filme aumentaram significativamente com a elevação do pH e força iônica, sendo que em força iônica elevada os valores foram ainda maiores. Para os filmes CL/CDs, com a elevação do pH e da força iônica, a quantidade de CDs depositado aumentou, porém não se observou diferenças significativas na quantidade de massa depositada e na espessura entre os filmes de pH e força iônica elevados. Além disso, a energia de interação, obtida por calorimetria isotérmica, é maior em pH e força iônica mais baixos. Em adição, quando

comparados aos filmes QT/*CDs*, os filmes CL/*CDs* apresentaram valores de espessura inferiores.

Acreditamos que esta variação entre os filmes QT/*CDs* e CL/*CDs* está relacionada às cargas superficiais dos biopolímeros, pois a QT apresenta uma quantidade superior de cargas positivas em sua cadeia, se comparada ao CL.

Por fim, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a estrutura do filme, isto é, a morfologia e a espessura, podem ser facilmente controladas e reproduzidas controlando as condições das soluções, além do tradicional número de imersões. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para investigações futuras de novas estruturas baseadas em filmes *LbL* utilizando-se *Carbon Dots* para o desenvolvimento de novos nanodispositivos que podem ser aplicados em imunossensores, superfícies fotoativas, revestimentos funcionais, filmes de proteção UV e dispositivos relacionados com a produção e conversão de energia.

Referências

ALMODÓVAR, J., *et al.* Layer-by-Layer Assembly of Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Multilayers: A Spectroscopic Study of Hydrophilicity, Composition, and Ion Pairing, **Biomacromolecules**, v. 12, p. 2755-2765, 2011.

ALVES, L. A. **Carbon Dots como fotossensibilizadores em reações de polimerização**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016a.

ALVES, L. A. *et al.* Characterization of acid functional groups of carbon dots by nonlinear regression data fitting of potentiometric titration curves. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 486-495, 2016b.

AN, B., LIN, Y.-S., BRODSKY, B. Collagen interactions: Drug design and delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 69–84, 2016.

AN, Z., *et al.* Microstructuring of carbon nanotubes-nickel nanocomposite. **Nanotechnology**, v. 26, p. 195601 (8pp), 2015.

ARAÚJO, T. C. *et al.* Hybrid heterostructures based on hematite and highly hydrophilic carbon dots with photocatalytic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 182, p. 204-212, 2016.

ATKINS, P., JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2006.

BAKER, S.N.; BAKER, G.A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 6726-6744, 2010.

BAO, L., *et al.* Electrochemical Tuning of Luminescent Carbon Nanodots: From Preparation to Luminescence Mechanism. **Advanced Materials**, v. 23, p. 5801–5806, 2011.

BARBOSA, L. C. de A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1 ed. Viçosa: Editora UFV, 2007.

BODDOHI, S., KILLINGSWORTH, C. E., KIPPER, M. J., Polyelectrolyte Multilayer Assembly as a Function of pH and Ionic Strength Using the Polysaccharides Chitosan and Heparin, **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2021-2028, 2008.

BORGES, J., MANO, J.F. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 8883-8942, 2014.

BOUCHEMAL, K., MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin–guest interactions. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 623–629, 2012.

BOURLINOS, A. B., *et al.* Surface functionalized carbogenic quantum dots. **Small**, v. 4, p. 455–458, 2008.

BOZETINE H., *et al.* Green chemistry approach for the synthesis of ZnO–carbon dots nanocomposites with good photocatalytic properties under visible light. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 465, p. 286–294, 2016.

BRUGNEROTTO, J., *et al.*, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569–3580, 2001.

CAMPANA F^o, S. P., SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 169–173, 2001.

CARVALHO, R. M. de, RATH, S., KUBOTA, L. T. SPR – Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, p. 97–104, 2003.

CHAI, N.-N., *et al.*, Well-controlled layer-by-layer assembly of carbon dot/CdS heterojunctions for efficient visible-light-driven photocatalysis, **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, p. 16613–16620, 2015.

CHAPRA, S.C., CANALE, R.P., Numerical methods for engineers: with programming and software applications. 1998: WCB/McGraw-Hill.

CHEN, W. Y., *et al.* Effect of the ionic strength of the media on the aggregation behaviors of high molecule weight chitosan, **Journal of Polymer Research**, v. 18, p. 1385–1395, 2011.

CHIOU, M.-S., HO, P.-Y., LI, H.-Y. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. **Dyes and Pigments**, v. 60, p. 69–84, 2004.

DABBOUSI, B. O., *et al.* (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, p. 9463–9475, 1997.

DABÓCZI, M., *et al.* Bilayered (silica–chitosan) coatings for studying dye release in aqueous media: The role of chitosan properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 137–145, 2016.

DAMOS, F. S. **Aplicação da ressonância de plásmon de superfície e da microbalança de cristal de quartzo na investigação de processos interfaciais visando o desenvolvimento de sensores**. 2006. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2006.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, v. 277, p. 1232–1237, 1997.

ESTEVES, A. C. C., BARROS-TIMMONS, A., TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798–806, 2004.

FIGUEIREDO, J. L., *et al.* Modification of the surface chemistry of activated carbons. **Carbon**, v. 37, p. 1379-1389, 1999.

FREUDENBERG, U., *et al.* Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 2108–2119, 2007.

FRIEDMAN, M., JUNEJA, V. K. Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1737–1761, 2010.

FRIESS, W., Collagen – biomaterial for drug delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.

GAO, L., *et al.* pH- and Redox-Responsive Polysaccharide-Based Microcapsules with Autofluorescence for Biomedical Applications. **Chemistry a European Journal**, v. 18, p. 3185–3192, 2012.

GONÇALVES, H. M. R., *et al.* Layer-by-layer immobilization of carbon dots fluorescent nanomaterials on single optical fiber, **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 90-95, 2012.

GORGULHO, H. F., *et al.*, Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption. **Carbon**, v. 46, p. 1544-1555, 2008.

GUO, F., *et al.* A novel amperometric hydrogen peroxide biosensor based on electrospun Hb–collagen composite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 140–145, 2011.

HEIN, S., *et al.*, Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. **Materials Science and Technology**, v. 24, p. 1053-1061, 2008.

HU, S.-L., *et al.* One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 484–488, 2009.

HUANG, J. J., *et al.* An easy approach of preparing strongly luminescent carbon dots and their polymer based composites for enhancing solar cell efficiency. **Carbon**, v. 70, 190–198, 2014.

HUANG, Q., *et al.*, Carbon dots and chitosan composite film based biosensor for the sensitive and selective determination of dopamine, **Analyst**, v. 138, p. 5417-5423, 2013.

IZZATI, W. A., *et al.* Partial Discharge Characteristics of Polymer Nanocomposite Materials in Electrical Insulation: A Review of Sample Preparation Techniques, Analysis Methods, Potential Applications, and Future Trends. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 14 páginas, 2014.

JIANG, B., *et al.* Organic–Inorganic Nanocomposites via Placing Monodisperse Ferroelectric Nanocrystals in Direct and Permanent Contact with Ferroelectric Polymers. **Journal of American Chemical Society**, v. 137, p. 11760–11767, 2015.

KASAAI, M. R. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 1667–1676, 2009.

KASAAI, M. R., Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data, **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.

KATO, T., AOSHIMA, S., KIKUCHI, H. Special Issue: Self-Assembled Materials. **Polymer Journal**, v. 44, p. 451, 2012.

KONG, M., *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51–63, 2010.

KONWAR, A., *et al.* Green chitosan–carbon dots nanocomposite hydrogel film with superior properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 238-245, 2015.

KUMAR, M. N. V. R., *et al.* Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, 2004.

LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LAU, W. J., *et al.* A review on polyamide thin film nanocomposite (TFN) membranes: History, applications, challenges and approaches. **Water Research**, v. 80, p. 306–324, 2015.

LEE, C. H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1 – 22, 2001.

LEE, T., *et al.* Layer-by-Layer Assembly for Graphene-Based Multilayer Nanocomposites: Synthesis and Applications. **Chemistry of Materials**, v. 27, p. 3785-3796, 2015.

LI, H., *et al.* Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 24230-24253, 2012.

LI, H., *et al.* Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 4430-4434, 2010.

LI, J., *et al.* A novel hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin-collagen-CNTs composite nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 77–82, 2014.

LI, W., *et al.* Preparation and properties of cellulose nanocrystals reinforced collagen composite films. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 102, p. 1131–1139, 2014.

LI, X.-b., JIANG, X.-y. Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes. **New Carbon Materials**, v. 25, p. 237-240, 2010.

LI, Y., *et al.* Viscosity of Collagen Solutions: Influence of Concentration, Temperature, Adsorption, and Role of Intermolecular Interactions, **Journal of Macromolecular Science**, v. 55, p. 893-901, 2014.

LIM, S. Y., SHEN, W., GAO, Z., Carbon quantum dots and their applications, **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 362-381, 2015.

LIMA, E. C. D., MASINI, J. C., Acid base characterization of the surface of mixed species of algae Spirulin by potentiometric titration and discrete site distribution model. **Quimica Nova**, v. 22, p. 679-683, 1999.

LIN, D., *et al.* The effect of ionic strength and pH on the stability of tannic acid-facilitated carbon nanotube suspensions, **Carbon**, v. 47, p. 2875-2882, 2009.

LIU, D., *et al.* Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards, **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782-785, 2006.

LIU, Y., YU, Y.-X., ZHANG, W.-D. Carbon quantum dots-doped CdS microspheres with enhanced photocatalytic performance. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 569, p. 102-110, 2013.

LJUNGBERG, N., CAVAILLE, J.-Y., HEUX, L. Nanocomposites of isotactic polypropylene reinforced with rod-like cellulose whiskers. **Polymer**, v. 47, p. 6285-6292, 2006.

LOCKHART, D. J., KIM, P. S. Electrostatic Screening of Charge and Dipole Interactions with the Helix Backbone. **Science**, v. 260, p. 198-202, 1993.

LUNDIN, M., *et al.* Layer-by-Layer Assemblies of Chitosan and Heparin: Effect of Solution Ionic Strength and pH, **Langmuir**, v. 27, p. 7537-7548, 2011.

LUO, D., *et al.* Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. **Materials Letters**, v. 65, p. 2395-2397, 2011.

MASINI, J. C., *et al.*, Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, p. 223-233, 1998.

MASINI, J. C., GODINHO, O. E. S., ALEIXO, L. M., Determination of ionizable groups of proteins by potentiometric titration in concentrated solutions of guanidine hydrochloride. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 104-111, 1998.

MESQUITA, J. P. de, MARTELLI, P. B., GORGULHO, H. D. F. Characterization of copper adsorption on oxidized activated carbon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1133-1143, 2006.

MESQUITA, J. P. DE, DONNICI, C. L., PEREIRA, F. V., Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan, **Biomacromolecules**, v. 11, p. 473-480, 2010.

MESQUITA, J. P. de, *et al.* Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan, **Biomacromolecules**, v. 11, p. 473-480, 2010.

MESQUITA, J. P. de. **Nanocrístais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**. 2012. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MESQUITA, J.P. de, *et al.* Hybrid layer-by-layer assembly based on animal and vegetable structural materials: multilayered films of collagen and cellulose nanowhiskers. **Soft Matter**, v. 7, p. 4405-4413, 2011.

MORAES, S. B. DE, BOTAN, R., LONA, L. M. F. Síntese e caracterização de nanocompósitos de poliestireno/hidroxissal lamelar. **Química Nova**, v. 37, p. 18-21, 2014.

NAMDARI, P., NEGAHDARI, B., EATEMADI, A. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 209–222, 2017.

NING, L., *et al.* Preparation and assembly of collagen–DNA complex on an electrodesurface and its application to protein analysis. *Electrochimica Acta*, v. 111, p. 499–503, 2013.

PANG, S., *et al.* Fluorescent carbon dots sensor for highly sensitive detection of guanine. **Sensors and Actuators B**, v. 222, p. 857–863, 2016.

PEARSON, R. G., Absolute electronegativity and hardness: application to inorganic chemistry, **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 734-740, 1988.

PENG, H., TRAVAS-SEJDIC, J. Simple Aqueous Solution Route to Luminescent Carbogenic Dots from Carbohydrates. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 5563–5565, 2009.

PILLAI, C. K. S., PAUL, W., SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641–678, 2009.

PINTO, T. da, S., *et al.* Layer-by-layer self-assembly for carbon dots/chitosan-based multilayer: Morphology, thickness and molecular interactions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 186, p. 81–89, 2017.

PODSIADLO, P., *et al.* Counterintuitive Effect of Molecular Strength and Role of Molecular Rigidity on Mechanical Properties of Layer-by-Layer Assembled Nanocomposites, **Nano Letters**, v. 7, p. 1224-1231, 2007b.

PODSIADLO, P., *et al.* Ultrastrong and Stiff Layered Polymer Nanocomposites. **Science**, v. 318, p. 80-83, 2007a.

QI, P., *et al.* A new collagen solution with high concentration and collagen native structure perfectly preserved. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 87180–87186, 2015.

RAHIMI, S., *et al.* Optimization of lead removal from aqueous solution using goethite/chitosan nanocomposite by response surface methodology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, p. 216–225, 2015.

RAM, M. K. *et al.* Physical Properties of Polyaniline Films: Assembled by the Layer-by-Layer Technique. **Langmuir**, v. 15, p. 1252-1259, 1999.

RAYMOND, L., MORIN, F. G., MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331–336, 1993.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

RYZHENKOV, A. V., KLASSEN, N. V., MASALOV, V. M. Features of Structure and Properties of Biopolymer Composites with Inorganic Nanoparticles. **Inorganic Materials: Applied Research**, v. 5, p. 312–317, 2014.

SAMPATH, U. G. T. M., *et al.* Fabrication of Porous Materials from Natural/Synthetic Biopolymers and Their Composites. **Materials**, v. 9, 991, p. 1–32, 2016.

SASKA, S., *et al.* Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 22102–22112, 2012.

SATO, K. *et al.* pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 809–821, 2011.

SHENG, K., *et al.* Layer-by-layer assembly of graphene/polyaniline multilayer films and their application for electrochromic device. **Polymer**, v. 52, p. 5567–5572, 2011.

SHENG, M., *et al.*, Carbon nanodots-chitosan composite film: A platform for protein immobilization, direct electrochemistry and bioelectrocatalysis, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 58, p. 351–358, 2014.

SHIM, B. S., *et al.* Nanostructured Thin Films Made by Dewetting Method of Layer-By-Layer Assembly, **Nano Letters**, v. 7, p. 3266–3273, 2007.

SILVA, J. C. G. E. da, GONÇALVES, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1327–1336, 2011.

SILVA, T. F. da, PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, p. 530–539, 2012.

SORLIER, P., *et al.* Light Scattering Studies of the Solution Properties of Chitosans of Varying Degrees of Acetylation, **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1034–1040, 2003.

SORLIER, P., *et al.* Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan, **Biomacromolecules**, v. 2, p. 765–772, 2001.

SORLIER, P., VITON, C., DOMARD, A., Relation between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan: Role of Aging, **Biomacromolecules**, v. 3, p. 1336–1342, 2002.

SRIVASTAVA, S., KOTOV, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, p. 1831–1841, 2008.

TAO, H., *et al.* In Vivo NIR Fluorescence Imaging, Biodistribution, and Toxicology of Photoluminescent Carbon Dots Produced from Carbon Nanotubes and Graphite. **Small**, v. 8, p. 281–290, 2012.

TIAN, R., *et al.* Tailoring surface groups of carbon quantum dots to improve photoluminescence behaviors. **Applied Surface Science**, v. 301, p. 156-160, 2014.

TONHI, E., PLEPIS, A. M. de G. Obtenção e caracterização de blendas de colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, p. 943–948, 2001.

TRIGUEIRO, J. P. C., *et al.* Layer-by-layer assembled films of multi-walled carbon nanotubes with chitosan and cellulose nanocrystals. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 214-220, 2014.

TUERHONG, M., XU, Y., YIN X. Review on Carbon Dots and Their Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, p. 139–150, 2017.

VALE, B. R. C., *et al.* Efeito da estrutura molecular de ligantes de superfície em pontos quânticos de cdte dispersos em água. **Química Nova**, v. 38, p. 22-29, 2015.

VAN DEN BROEK, L. A. M., *et al.* Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 237–242, 2015.

VARGAS, M., *et al.* 5 - Edible chitosan coatings for fresh and minimally processed foods A2 - Yam, Kit L, in: D.S. Lee (Ed.), **Emerging Food Packaging Technologies**, Woodhead Publishing, p. 66-95, 2012.

VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

WALLACE, D. G., ROSENBLATT, J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1631 – 1649, 2003.

WANG, H., *et al.* High fluorescence S, N co-doped carbon dots as an ultra-sensitive fluorescent probe for the determination of uric acid. **Talanta**, v. 155, p. 62–69, 2016.

WANG, L., *et al.* Carbon quantum dots displaying dual-wavelength photoluminescence and electrochemiluminescence prepared by high-energy ball milling. **Carbon**, v. 94, p. 472–478, 2015.

WANG, Y., *et al.* Luminescent carbon dots in a new magnesium aluminophosphate zeolite. **Chemical Communications**, v. 49, p. 9006-9008, 2013.

WANG, Y., HU, A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, p. 6921-6939, 2014.

WISEMAN, T., *et al.* Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, p. 131-137, 1989.

WU, C., *et al.* Field emission arrays fabricated utilizing conjugated ZnO quantum dot/carbon nanotube hybrid nanocomposite. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 4539–4542, 2011.

WU, T., ZIVANOVIC, S., Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method, **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 248-253, 2008.

XU, X., *et al.* Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 12736-12737, 2004.

XU, Y., *et al.* Applications of carbon quantum dots in electrochemiluminescence: A mini review. **Electrochemistry Communications**, v. 48, p. 151–154, 2014.

XU, Y., *et al.* Reduced Carbon Dots versus Oxidized Carbon Dots: Photo- and Electrochemiluminescence Investigations for Selected Applications. **Chemistry-a European Journal**, v. 19, p. 6282-6288, 2013.

YANG, S., *et al.* Supersensitive Detection of Chlorinated Phenols by Multiple Amplification Electrochemiluminescence Sensing Based on Carbon Quantum Dots/Graphene. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 7720–7725, 2013.

YANG, X., *et al.* Spectroscopy Study on the Interaction of Quercetin with Collagen, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3431-3435, 2009.

YU, X., *et al.* Preparation and visible light photocatalytic activity of carbon quantum dots/TiO₂ nanosheet composites. **Carbon**, v. 68, p. 718–724, 2014.

ZHANG, H., *et al.* Fe₂O₃/carbon quantum dots complex photocatalysts and their enhanced photocatalytic activity under visible light. **Dalton Transactions**, v. 40, p. 10822–10825, 2011.

ZHANG, W.-H., SHI, B. Effect of pH on structure and stability of collagen-like peptide: insight from molecular dynamics simulation. **Journal of Theoretical and Computational Chemistry**, v. 10, p. 245–259, 2011.

ZHU, S., *et al.*, The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): Current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, p. 355–381, 2015.

ZUBER, M., *et al.* Collagen based polyurethanes – A review of recent advances and perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 366–374, 2015.

Anexo

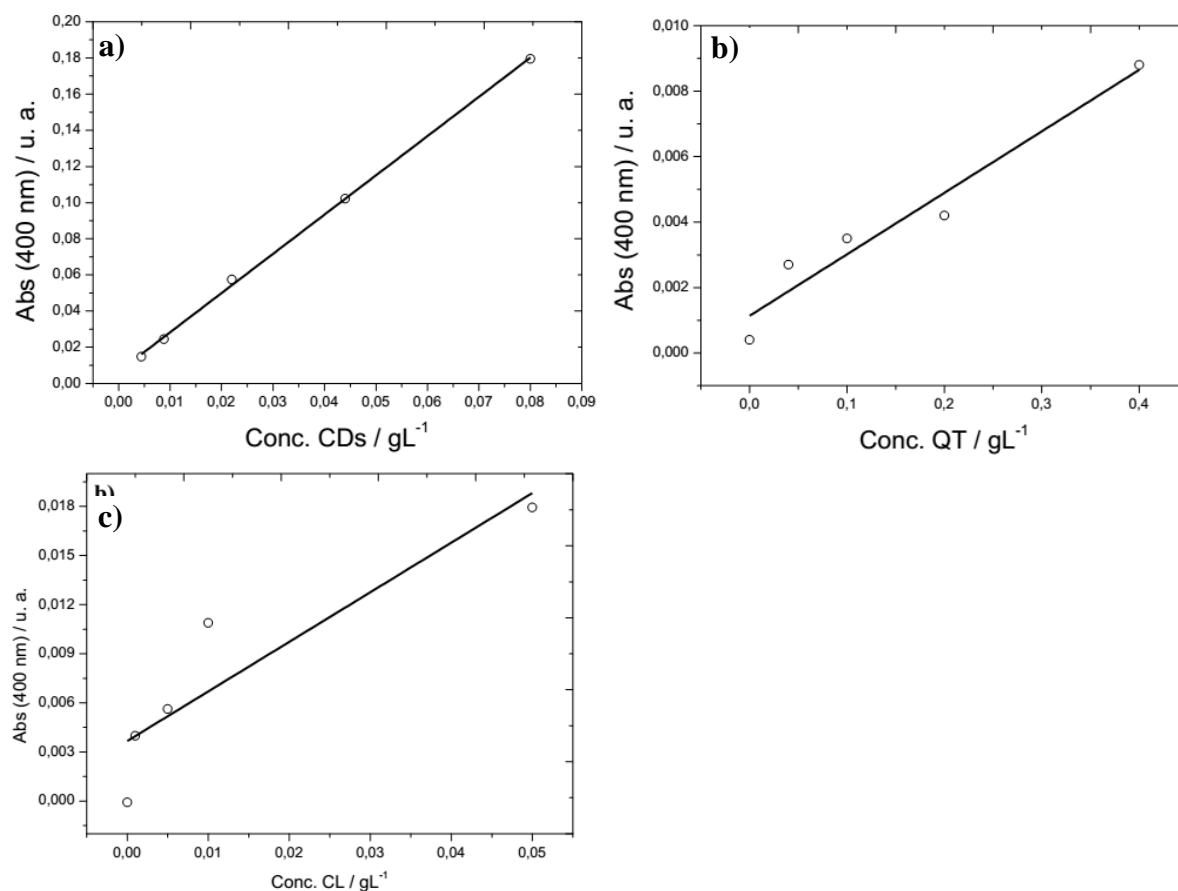
Capítulo IV

Os valores de absorvidade molar (ϵ) foram obtidos no comprimento de onda de 400 nm a partir da relação linear da absorbância em função das diferentes concentrações dos polímeros, QT e CL, e das nanopartículas, *CDs*. Os valores de ϵ foram obtidos através do auxílio da Lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Em que A é a absorbância, ϵ a absorvidade molar, b o comprimento do caminho óptico (1 cm) e c a concentração do analito.

Figura 1. Absorbâncias em 400nm em função das concentrações das soluções de: (a) *CDs*; (b) QT; e (c) CL.



A inclinação das retas apresentadas na Figura 1, obtidas por regressão linear dos dados, foram de (a) $2,3 \text{ L.g}^{-1}$, (b) $0,022 \text{ L.g}^{-1}$ e (c) $0,45$ respectivamente. Substituindo os valores na Equação (1) e manipulando as dimensões, a absorvidade molar (ϵ) dos *Carbon Dots*, da quitosana e do colágeno, em 400 nm, são $0,23 \text{ m}^2/\text{g}$, $2,2 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{g}$ e $0,045 \text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente.

Capítulo V

A quantidade de *CDs* depositada (Figura 1b, Figura 2b) foi obtida a partir da relação entre a absorção dos filmes, em 400 nm (Figura 1a, Figura 2a), e a absortividade molar (ϵ) dos *CDs*, levando em consideração que a ϵ da QT é muito inferior, portanto o valor foi considerado como sendo apenas das nanopartículas.

Figura 1. (a) Absorbâncias em 400nm em função do número de bicamadas. (b) Massa de *CDs* depositada.

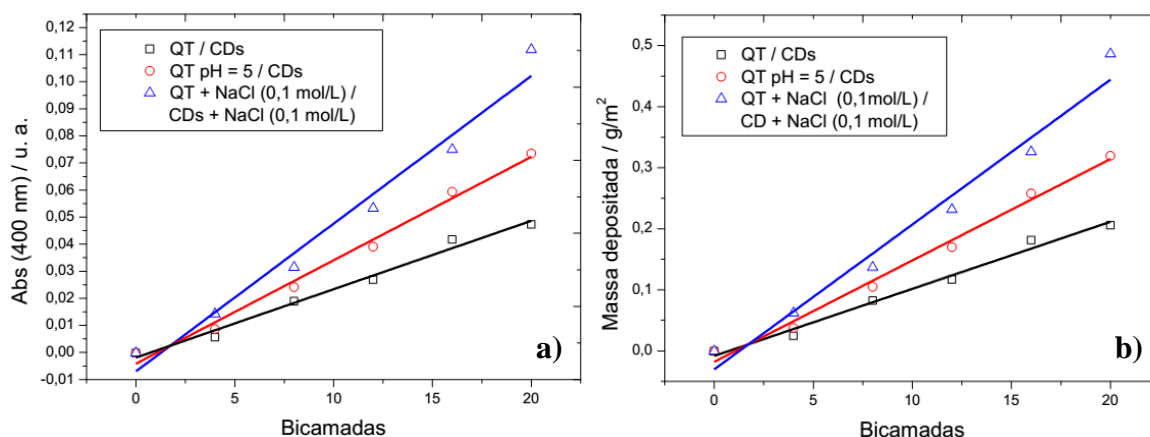
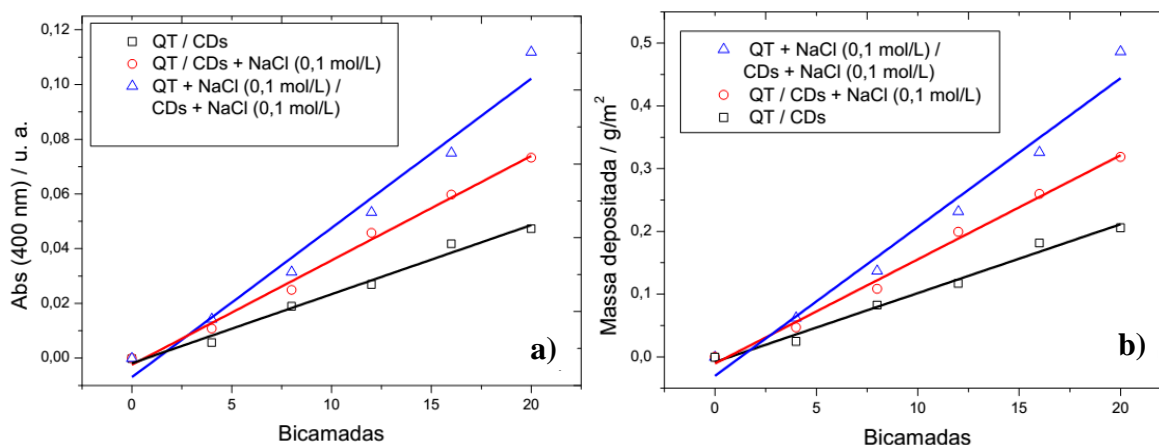


Figura 2. (a) Absorbâncias em 400nm em função do número de bicamadas. (b) Massa de *CDs* depositada.



Capítulo VI

A quantidade de *CDs* depositada (Figura 1b, Figura 2b) foi obtida a partir da relação entre a absorção dos filmes, em 400 nm (Figura 1a, Figura 2a), e a absortividade molar (ϵ) dos *CDs*, levando em consideração que a maior parte da absorção pertence às nanopartículas. Portanto fez-se uma aproximação na qual o valor foi considerado como sendo apenas dos *CDs*.

Figura 1. (a) Absorbâncias em 400nm em função do número de bicamadas. (b) Massa de *CDs* depositada.

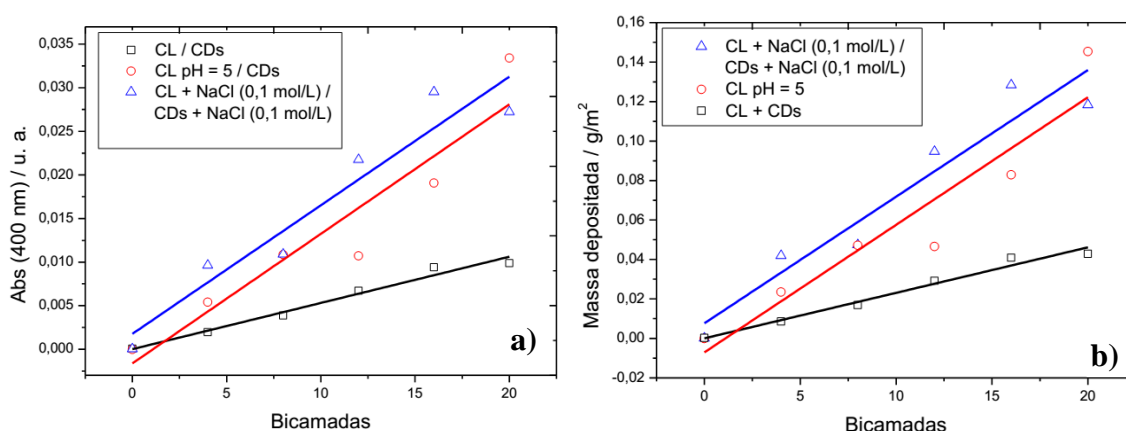
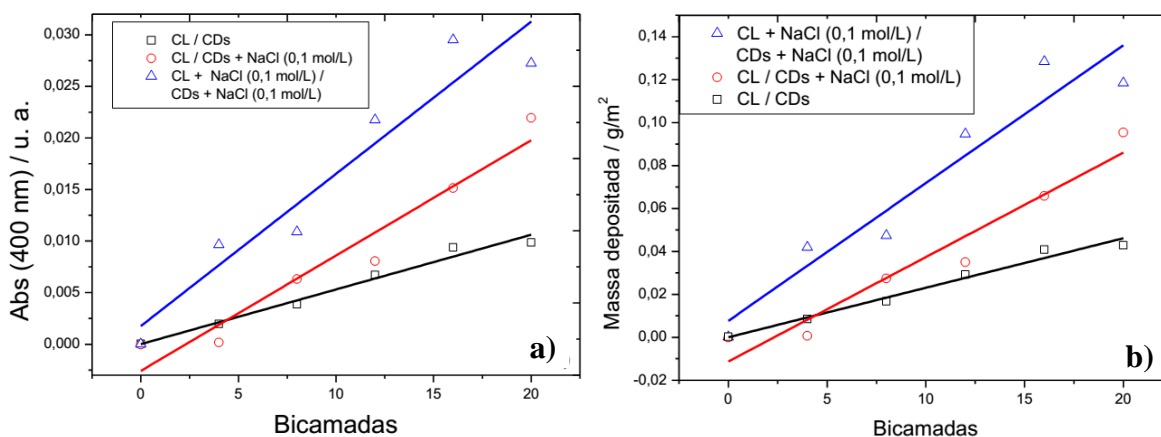


Figura 2. (a) Absorbâncias em 400nm em função do número de bicamadas. (b) Massa de *CDs* depositada.



Produções

✓ Artigo Publicado

“Layer-by-Layer self-assembly for Carbon Dots/Chitosan-based Multilayer: Morphology, Thickness and Molecular Interactions”

Autores: Tarciane da S. Pinto, Larissa A. Alves, Gabriele A. Cardoso, Victor H. Munhoz, Rodrigo M. Verly, Fabiano V. Pereira, João P. de Mesquita.

✓ Trabalho apresentado em congresso

“Filmes automontados preparados com quitosana e *Carbon Dots*”

Autores: Tarciane da S. Pinto, Larissa A. Alves, Gabriele A. Cardoso, Victor H. Munhoz, Rodrigo M. Verly, Fabiano V. Pereira, João P. de Mesquita.

Evento: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química.